

**EFFETS COMBINÉS DE L'EXPOSITION AUX PESTICIDES ET À DES
ECTOPARASITES HÉMATOPHAGES SUR LA PHYSIOLOGIE DES
OISILLONS DE L'HIRONDELLE BICOLORE**

par

Audrey Sigouin

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, août 2020

Le 6 août 2020

Le jury a accepté le mémoire de madame Audrey Sigouin dans sa version finale.

Membres du jury

Professeure Fanie Pelletier
Directrice de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Marc Bélisle
Codirecteur de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Dany Garant
Évaluateur interne
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeure Sophie Calmé
Président-rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

À mes parents

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice, Fanie Pelletier, de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné la liberté de développer ce projet selon mes intérêts. Ton encadrement m'a permis à la fois de pousser mon projet plus loin scientifiquement, mais aussi de me développer comme jeune chercheuse de manière plus indépendante. Je remercie également mon codirecteur, Marc Bélisle, dont la porte toujours ouverte a permis des discussions enlevantes autant sur les approches statistiques que sur le parfait *grilled-cheese*. Merci aussi à Dany Garant pour ses conseils sur mon article, à Sophie Calmé d'avoir agi comme conseillère dans mon comité, à Joëlle Brodeur pour son aide en laboratoire et à François Rousseau pour ses conseils en statistiques. J'adresse également mes remerciements au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada et à l'Université de Sherbrooke pour leur soutien financier. Merci aux membres du laboratoire Pelletier, ainsi qu'à ceux des laboratoires Bélisle, Garant et Festa-Bianchet. Vous êtes tous et toutes des humains merveilleux et votre présence comme collègues, mais surtout comme ami(e)s, a illuminé mon parcours aux études graduées. Merci également à toutes les personnes qui ont participé au terrain Hirondelles ces deux derniers étés, votre bonne humeur était indispensable lors de ces longues journées. Un merci tout spécial à Ève Courtois et Esther Carle-Pruneau, mes *partners in crime* pour ces deux belles années. Quelle chance que j'aie de vous avoir dans ma vie, vous avez joué un rôle important dans mon cheminement et votre amitié m'est aussi précieuse qu'une heure de sommeil de plus un matin de terrain. Je tiens également à remercier ma famille. Tout d'abord, matante Francine, merci pour ton support moral quotidien et tes encouragements. Tu as été d'une grande aide tout au long de ces deux années. Finalement, un merci tout spécial à mes parents. Malgré les milliers de kilomètres qui nous ont séparés les 7 dernières années, vous avez toujours su avoir les bons mots pour m'encourager. Vous avez cru en moi et en mes ambitions et vous êtes le moteur à la base de tous mes accomplissements. J'ai une chance immense de vous avoir et je ne serais pas rendue à cette étape importante de ma vie sans votre support indéfectible.

SOMMAIRE

Dans un contexte d'intensification des pratiques agricoles, un processus s'étant accru depuis les années 1970, les pesticides sont utilisés de manière croissante et se retrouvent en grande quantité dans l'environnement. Bien que leur toxicité soit vérifiée en laboratoire, les tests utilisés sont peu représentatifs des conditions en milieu naturel. Par exemple, lors de ces tests, on ne vérifie pas les effets « cocktails » survenant lorsque plusieurs substances sont mélangées. De plus, les tests sont effectués sur des périodes de temps relativement courtes, alors que les organismes en milieu naturel peuvent être exposés sur de longues périodes de temps. Également, ceux-ci ne reflètent pas la complexité du milieu naturel, où les organismes peuvent être exposés à d'autres pressions environnementales, tel le parasitisme. En effet, bien que les pesticides en eux-mêmes puissent avoir des effets délétères sur la santé des organismes, ils sont également susceptibles d'agir en synergie avec le parasitisme et affecter plus fortement les individus exposés à de multiples pressions. Alors que ces effets combinés ont été étudiés chez des espèces aquatiques et semi-aquatiques, très peu d'études se sont penchées sur ce phénomène chez des vertébrés terrestres comme les oiseaux.

L'objectif de mon projet était de vérifier les effets de l'exposition combinée à des pesticides agricoles et à des ectoparasites hématophages du genre *Protocalliphora* sur des marqueurs physiologiques de l'Hirondelle bicolor (*Tachycineta bicolor*). Cet insectivore aérien, comme plusieurs autres espèces de ce groupe, a vu ses effectifs décliner de manière importante depuis les années 1970 et l'utilisation accrue de pesticides en milieu agricole figure parmi les moteurs probables à l'origine de ce déclin. Pour atteindre cet objectif, j'ai utilisé des données issues du suivi d'une population d'Hirondelle bicolor dans le Sud du Québec pour les années 2013 à 2015, où nous avons mesuré l'hématocrite, la capacité bactéricide du plasma (BKA) et le nombre de leucocytes chez plusieurs centaines d'oisillons. Nous avons également mesuré l'exposition des oisillons à une cinquantaine de

pesticides grâce à une méthode novatrice permettant la détection de ces substances directement dans les insectes dont ils se nourrissent.

Mes résultats montrent que l'hématocrite des oisillons est négativement influencé par l'exposition combinée aux pesticides et aux parasites. Les globules rouges étant liés à la capacité aérobique des individus, cela pourrait affecter la migration et le recrutement dans cette population. Cependant, le BKA était négativement affecté uniquement par la charge parasitaire et les leucocytes n'étaient pas affectés par les pesticides ou les parasites. Les limites de ma recherche et les perspectives futures qui en découlent sont discutées en détail dans le troisième chapitre de ce mémoire.

Mes recherches montrent l'importance des études toxicologiques en milieu naturel pour évaluer correctement les effets des pesticides sur la faune, puisque ceux-ci peuvent être modulés par l'exposition à d'autres facteurs. Le contraste entre l'expression des différents marqueurs selon l'exposition aux pressions environnementales montre la complexité de l'étude des systèmes physiologiques en milieu naturel. L'omniprésence des pesticides dans l'environnement est inquiétante et nous comprenons encore trop peu leurs effets sur la faune sauvage, d'où l'importance de mener plus d'études, particulièrement pour mieux comprendre leur rôle potentiel dans le déclin de certaines espèces.

Mots-clés : Pesticides, *Protocalliphora* sp., Hirondelle bicolore, *Tachycineta bicolor*, intensification agricole, écotoxicologie, écophysiologie.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Cadre théorique	1
1.1.1 Intensification agricole	1
1.1.2 Effets de l'intensification agricole sur la faune	2
1.1.3 Pesticides agricoles	4
1.1.4 Toxicité des pesticides.....	6
1.1.4.1 Immunotoxicité	6
1.1.4.2 Neurotoxicité.....	9
1.1.4.3 Limites des tests en laboratoire.....	10
1.1.5 Parasitisme et ses effets	12
1.1.6 Effets combinés de l'exposition aux pesticides et aux parasites.....	14
1.2 Objectif et importance du projet	16
1.3 Méthodologie générale	17
1.3.1 Modèle d'étude	17
1.3.2 Aire d'étude	19
CHAPITRE 2	20
PESTICIDES AGRICOLES ET PARASITES: POSSIBLES EFFETS COMBINÉS SUR LA PHYSIOLOGIE D'UN INSECTIVORE AÉRIEN EN DÉCLIN	20
2.1 Introduction de l'article.....	20
Agricultural pesticides and parasites: possible combined effects on physiology of a declining aerial insectivore	21

2.2 Abstract	21
2.3 Introduction	22
2.4 Materials and methods	26
2.4.1 Study area and population	26
2.4.2 Bolus collection and pesticide analysis	27
2.4.3 Parasite quantification	28
2.4.4 Blood sampling and hematocrit measure	28
2.4.5 Bacterial killing ability (BKA) assays	29
2.4.6 Leucocytes counts	29
2.4.7 Statistical analyses	30
2.4.7.1 Multivariate analyses	30
2.4.7.2 Univariate analyses	31
2.5 Results	33
2.5.1 Multivariate analysis	33
2.5.2 Univariate analysis	34
2.5.2.1 Hematocrit	34
2.5.2.2 BKA	37
2.5.2.3 Leucocyte counts	38
2.6 Discussion	41
2.7 Concluding remarks	46
2.8 References	47
CHAPITRE 3	57
DISCUSSION ET CONCLUSION	57
3.1 Retour sur les objectifs et les résultats	57

3.2 Limites de l'étude	59
3.3 Perspectives	60
3.4 Conclusion.....	62
ANNEXE	63
BIBLIOGRAPHIE	82

LISTE DES TABLEAUX

Table 1	Estimates of the best model predicting hematocrit in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	35
Table 2	Estimates of the best model predicting the bacteria-killing ability of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	37
Table 3	Estimates of the best model predicting the number of granulocytes of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	39
Table 4	Estimates of the best model predicting the number of monocytes of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	40
Table 5	Estimates of the best model predicting the number of lymphocytes of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	40
Table S1	Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and detection frequency for 54 compounds tested between 2013 and 2015 in insect boluses collected in 10 farms in southern Québec, Canada.	65
Table S2	Summary of statistical methods used for candidate model selection of the different physiological markers and their respective sample size.	66
Table S3	Candidate model for hematocrit and information criterion.	67

Table S4	Candidate model for bacteria-killing ability and information criterion.	68
Table S5	Candidate model for granulocytes and information criterion.	69
Table S6	Candidate model for monocytes and information criterion.	70
Table S7	Candidate model for lymphocytes and information criterion.	71
Table S8	Estimates for second best model to predict hematocrit measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	72
Table S9	Estimates for third-best model to predict hematocrit measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	73
Table S10	Estimates for second best model to predict bacteria-killing ability measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	74
Table S11	Estimates for third-best model to predict bacteria-killing ability measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	75
Table S12	Estimates for second best model to predict granulocytes number measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	76

Table S13 Estimates for third-best model to predict granulocytes number measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	77
Table S14 Estimates for second best model to predict monocytes number measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	78
Table S15 Candidate model for granulocyte/lymphocyte ratio and information criterion.	79
Table S16 Estimates for best model to predict granulocyte/ lymphocyte ratio measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	80
Table S17 Estimates for second best model to predict granulocyte/ lymphocyte ratio measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	81

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Effets directs et indirects de l'intensification agricole sur la reproduction, la survie des jeunes et la survie des adultes pouvant ultimement mener au déclin des populations aviaires.	3
Figure 2	Diagramme illustrant les différents types d'exposition à des substances toxiques, par exemple les pesticides.	11
Figure 3	Jeune Hirondelle bicoloré âgée d'environ 2 jours. Larve de <i>Protocalliphora</i> fixée sur un oisillon	18
Figure 4	Map of study system in southern Québec, Canada.	26
Figure 5	Compositional PCA of physiological markers (hematocrit, BKA, number of granulocytes, number of lymphocytes and number of monocytes) and environmental data (number of contaminated boluses "Pesticides", and number of <i>Protocalliphora</i> "Parasites").	34
Figure 6	Effect of pesticides and parasites on nestling hematocrit measured in southern Québec, Canada, 2013-2015.	36
Figure 7	Effect of A) pesticide exposure (number of contaminated boluses) and B) parasite load (number of <i>Protocalliphora</i>) on bacteria-killing ability of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.	38

Figure S1 Frequency of coefficients (grey bars), lower (blue bars) and upper (red bars) 95 % confidence intervals (CI) obtained with a 50 iterations rerunning of the best model to predict hematocrit measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015. 63

Figure S2 Hematocrit measured in tree swallow nestlings in 2013-2015 as a function of total blood collected in a capillary tube. 64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AChE	Acétylcholinestérase
ARLA	Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire
BChE	Butyrylcholinestérase
BKA	Bacteria-killing ability (capacité bactéricide du plasma)
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
G/L	Ratio granulocytes / lymphocytes
LOD	Limit of detection (limite de detection)
LOQ	Limit of quantification (limite de quantification)
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation
MELCC	Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (anciennement le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Cadre théorique

1.1.1 Intensification agricole

L'intensification agricole est un processus qui s'est accru dans les dernières décennies et qui vise l'augmentation de la productivité des cultures par unité de surface à grande échelle (Donald *et al.*, 2001). La modification des pratiques agricoles au milieu du XXe siècle dans les pays industrialisés est notamment imputable à l'augmentation des besoins alimentaires et à la raréfaction des terres cultivables dans un contexte global d'augmentation de la population (Matson *et al.*, 1997), ce qui a mené vers une utilisation plus intensive des espaces pour répondre aux exigences du marché. L'intensification des pratiques passe notamment par la mécanisation des procédés, la simplification des rotations de culture et l'utilisation accrue d'engrais et de pesticides, qui ont eu pour effet l'homogénéisation du paysage (Benton *et al.*, 2003). Par exemple, entre 1965 et 1997 dans le Sud du Québec, les surfaces occupées par les cultures pérennes (ex. prairies et pâturages), qualifiées de cultures extensives, ont diminué de 36 à 19 %, alors que les grandes cultures annuelles de maïs (*Zea mays*) et de soya (*Glycine max*), cultivées intensivement, ont augmentés de 17 à 29 % pour la même période (Jobin *et al.*, 2014). Bien que l'agriculture moderne permette d'assurer la survie de plusieurs milliards d'humains, le changement des pratiques agricoles présente de nombreux coûts pour l'environnement (Tilman *et al.*, 2002). Ces changements pourraient notamment participer à la diminution de la biodiversité observée dans ce type de paysage, puisque l'habitat devient fragmenté, dénaturé et pollué par des contaminants agricoles comme les fertilisants et les pesticides (Donald *et al.*, 2001, 2006; Geiger *et al.*, 2010; Tilman *et al.*, 2001, 2002). L'un des groupes fortement touchés par l'intensification agricole est celui des oiseaux champêtres (Chamberlain *et al.*, 2000; Murphy, 2003;

Rosenberg *et al.*, 2019; Stanton *et al.*, 2018), qui regroupe plusieurs espèces d'oiseaux insectivores aériens.

1.1.2 Effets de l'intensification agricole sur la faune

En Europe, où les paysages agricoles représentent 45 % de toutes les terres, Donald et ses collaborateurs se sont intéressés au déclin des oiseaux associés à ce type d'habitat, dit champêtres, dans la deuxième moitié du 20^e siècle dans deux méta-analyses (Donald *et al.*, 2001, 2006). Dans leur article de 2006, ils ont colligé les données de populations d'oiseaux pour l'ensemble des pays européens entre 1990 et 2000 et ont observé une diminution des populations pour 71 % des espèces champêtres étudiées. Parmi tous les groupes d'oiseaux considérés, ce sont ces derniers qui ont subi le plus grand déclin. En mettant en relation les données disponibles pour les décennies 1970-1990 et celles pour 1990-2000, ils ont également montré une continuité du déclin des oiseaux champêtres entre ces deux périodes. Un phénomène similaire est d'ailleurs observé en Amérique du Nord. Dans une revue récente, on estime que les populations d'insectivores aériens ont subi un déclin de près de 40 % entre 1966 et 2013 (Stanton *et al.*, 2018). Parmi toutes les espèces d'oiseaux associées aux milieux agricoles considérées dans cette revue, ce sont les insectivores aériens qui subissent le déclin le plus marqué (voir aussi NABCI, 2019).

Bien que notre compréhension du déclin des insectivores aériens soit encore succincte, la cause est vraisemblablement multifactorielle (Figure 1; Spiller et Dettmers, 2019). Dans leur revue, Stanton et al. (2018) proposent que ce déclin soit principalement dû à l'intensification des pratiques agricoles, particulièrement à la perte d'habitat de bonne qualité et à l'augmentation de l'utilisation des pesticides. En effet, une étude a montré que l'abondance des oiseaux champêtres est négativement corrélée à la taille des champs et positivement corrélée à la diversité des cultures et aux zones non cultivées (Kirk *et al.*, 2011). Ainsi, la diminution de la diversité des habitats en milieu agricole et leur altération participent au déclin de plusieurs espèces associées à ces milieux.

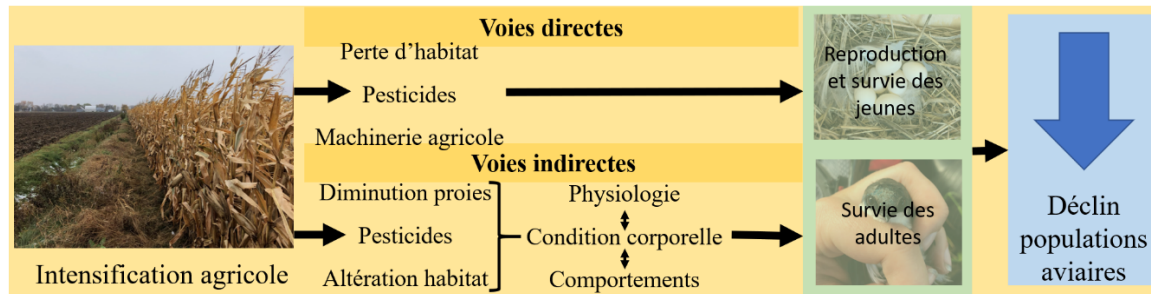


Figure 1 : Effets directs et indirects de l'intensification agricole sur la reproduction, la survie des jeunes et la survie des adultes pouvant ultimement mener au déclin des populations aviaires.

Les causes du déclin sont multifactorielles et les voies directes et indirectes peuvent agir simultanément (figure adaptée de Stanton *et al.* 2018).

Cependant, bien que la perte d'habitat de qualité participe au déclin des insectivores aériens, plusieurs études soulignent que les pesticides agricoles sont largement impliqués, de manière directe ou indirecte (Geiger *et al.*, 2010; Gibbs *et al.*, 2009; Hallmann *et al.*, 2014). Notamment, la diminution de la disponibilité d'insectes en milieu agricole contribuerait indirectement au déclin des oiseaux qui s'en nourrissent (Benton *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 1997; Møller, 2019; Stanton *et al.*, 2018). Par exemple, dans une étude menée dans le Sud du Québec, les auteurs ont montré que l'abondance des diptères, part importante du régime des insectivores aériens, était similaire sur des sites d'agriculture intensive et extensive en début de saison, mais, plus tard dans l'été, on retrouvait moins de ces proies sur les sites cultivés intensivement (Rioux Paquette *et al.*, 2013). Une hypothèse proposée pour expliquer cette diminution est qu'elle pourrait être attribuable à l'épandage plus marqué d'insecticides sur les cultures intensives au cours de la saison estivale. C'est d'ailleurs ce qu'ont montré des chercheurs en Grande-Bretagne, où l'application d'insecticides pendant la saison de reproduction des Bruants jaunes (*Emberiza citrinella*) a diminué la disponibilité de proies, avec des impacts négatifs sur la croissance et la survie des jeunes (Hart *et al.*, 2006). Des revues colligeant les données issues de plusieurs études concluent que plusieurs taxons d'insectes sont en effet en déclin à l'échelle mondiale (Didham *et al.*, 2020; Hallmann *et al.*, 2017; Klink *et al.*, 2020; Wagner, 2019), notamment les insectes ayant au moins un stade de vie aquatique (Cavallaro *et al.*, 2019; Roth *et al.*, 2020). L'agriculture intensive et l'augmentation des insecticides font partie des causes

probables de ce déclin (Cavallaro *et al.*, 2019; Hallmann *et al.*, 2017; Wagner, 2019) et peuvent donc entraîner des effets sur la chaîne trophique et affecter indirectement les insectivores aériens (Bright *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 1997; Møller, 2019).

Bien que les pesticides soient développés pour éliminer des espèces nuisibles, leur spécificité reste limitée et il peuvent affecter des processus cellulaires et physiologiques sur la faune non ciblée (Gibbons *et al.*, 2014; Zaller et Brühl, 2019). La toxicité des pesticides serait d'ailleurs un meilleur prédicteur du déclin des oiseaux champêtres aux États-Unis que l'intensification agricole (Mineau et Whiteside 2013). L'exposition à ces substances peut se faire par voie cutanée et par inhalation (Gibbons *et al.*, 2014; Mineau *et al.*, 1999), mais aussi via l'ingestion de semences enrobées (Hao *et al.*, 2018; Kwon *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2016) ou de proies contaminées (Kim *et al.*, 2016; Mineau *et al.*, 1999).

Bien qu'il existe des cas d'intoxication et de mortalité de masse chez les oiseaux suite à l'épandage de pesticides à grande échelle (Rogers *et al.*, 2019), des effets sublétaux plus subtils peuvent également affecter la faune en nuisant, par exemple, au bon fonctionnement des systèmes immunitaire (voir section 1.1.4.1 Immunotoxicité) et nerveux (voir section 1.1.4.2 Neurotoxicité) (Brandt *et al.*, 2016; Christin *et al.*, 2004; Gilbertson *et al.*, 2003).

1.1.3 Pesticides agricoles

Un pesticide est une substance ou un mélange de substances, que l'on utilise pour éloigner ou éliminer des organismes considérés comme des pestes (Mineau et Tucker 2002). Certains pesticides ont un champ d'action vaste, mais la plupart sont élaborés pour viser un type de peste particulier, par exemple les insectes, les herbes, les champignons, etc. Les pesticides sont généralement composés d'un ou de plusieurs ingrédients actifs qui confèrent sa toxicité au produit et des formulants, des agents inactifs dont le rôle est d'améliorer les propriétés physiques du produit pour en assurer la stabilité, l'adhérence ou l'absorption (MELCC, 2018).

Dans les dernières décennies, l'utilisation des pesticides agricoles a particulièrement augmenté avec la transition vers l'agriculture intensive (Dibartolomeis *et al.*, 2019). De

nouvelles molécules sont par ailleurs sans cesse développées et on observe des tendances dans l'utilisation des pesticides. Par exemple, depuis l'interdiction du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) dans plusieurs régions du monde vers 1970, l'industrie agrochimique a développé et commercialisé des substances insecticides considérées moins toxiques et persistantes, les carbamates et les organophosphates (Cox, 1991). Vers les années 1990, lorsque des résistances ont commencé à s'installer chez plusieurs insectes visés, ces substances ont été largement délaissées au profit de semences enrobées de néonicotinoïdes (Goulson, 2013; Mineau et Palmer, 2013; Simon-Delso *et al.*, 2015), une classe d'insecticide dont l'utilisation systématique de manière préventive est remise en question. C'est en effet la totalité des champs de maïs et environ la moitié des champs de soya qui sont ensemencées de graines enrobées de néonicotinoïdes au Québec (MELCC, 2015), bien qu'une étude récente ait montré l'inutilité de ces substances dans la plupart des cas (Labrie *et al.*, 2020). Du côté des herbicides, on retrouve notamment l'atrazine et le s-métolachlore parmi les substances les plus largement utilisées, mais c'est le glyphosate qui, depuis les années 1990 avec l'avènement des cultures modifiées pour être y être résistantes, est l'herbicide le plus utilisé dans le monde (Benbrook, 2016).

Au Québec, les pesticides sont omniprésents dans les cours d'eau en milieu agricole, et certains d'entre eux sont par ailleurs de plus en plus fréquemment détectés, notamment le glyphosate, l'imazéthapyr, le chlorantraniliprole, l'atrazine et les néonicotinoïdes (Giroux, 2019; Montiel-León *et al.*, 2019). Aux États-Unis, on observe une augmentation de 50 fois la charge toxique des pesticides dans l'environnement depuis les 26 dernières années (Dibartolomeis *et al.*, 2019). C'est-à-dire que non seulement les pesticides sont épandus de plus en plus intensivement, mais aussi qu'ils s'accumulent dans l'environnement et que les molécules utilisées sont de plus en plus toxiques. Toutefois, la détection des pesticides dans l'environnement représente un défi méthodologique, notamment dû aux faibles concentrations qu'on y retrouve et à la grande diversité des molécules rencontrées (Haroune *et al.*, 2015). Dans son rapport sur la présence de pesticides dans les eaux de surface du Québec, Giroux (2019) mentionne par exemple que les limites de détection et de quantification des molécules sont variables selon les méthodes d'analyses utilisées, ce qui rend difficile leur comparaison entre les études.

Dans ce contexte, la compréhension des effets directs des pesticides sur l'environnement et la faune non ciblée est capitale.

1.1.4 Toxicité des pesticides

Les pesticides peuvent avoir de nombreux effets délétères, tant sur la santé humaine que sur l'environnement et la santé des organismes sauvages (MAPAQ, 2015). En plus d'affecter les systèmes immunitaires et nerveux, tel que détaillé dans les prochaines sections, plusieurs pesticides ont des effets reconnus sur les systèmes endocriniens (revue par Mnif et al. 2011) et reproducteur (revue par Rohr et McCoy 2010), mais ceux-ci ne seront pas abordés dans la présente étude.

1.1.4.1 Immunotoxicité

Parmi les effets des pesticides les mieux documentés figure l'immunotoxicité (Blakley *et al.* 1999; Galloway et Handy 2003; Martin *et al.* 2010). Le système immunitaire assure la défense de l'organisme contre les pathogènes comme les bactéries, les virus et les parasites et est particulièrement important pour la faune sauvage qui y est invariablement exposée dans son milieu naturel (Sheldon et Verhulst 1996). Le contact avec un pathogène induit une réponse immunitaire chez l'hôte : il se met alors en marche une série complexe et organisée de réactions plus ou moins spécifiques qui conduiront ultimement à la destruction du pathogène (Coico et Sunshine 2015; Desforges *et al.* 2016).

L'ensemble des tissus, cellules et mécanismes liés à ce système peuvent être classés en deux grands types de réponses immunitaires: l'immunité innée et l'immunité adaptative (Coico et Sunshine 2015). La réponse immunitaire est induite par des interactions complémentaires du système inné et du système adaptatif et l'ensemble du système immunitaire travaille de concert avec d'autres systèmes physiologiques, comme le système nerveux (Galloway et Handy 2003). L'immunité innée a pour caractéristique le fait qu'elle

est présente dès la naissance de l'individu, est non-spécifique et n'implique pas de mémoire immunitaire: elle ne dépend donc pas du pathogène. Il s'agit d'une réaction très rapide, de quelques minutes à quelques heures (Delves *et al.*, 2017). L'immunité innée implique d'abord les barrières physiques ou chimiques empêchant l'entrée des pathogènes dans l'organisme, comme la peau, les muqueuses et la sécrétion d'acides gras (Coico et Sunshine 2015). Le second niveau de défense implique les leucocytes, ou globules blancs, des acteurs très importants de l'immunité innée qui circulent dans le système sanguin (Abbas *et al.*, 2016). Il existe différents types de leucocytes ayant chacun leurs spécialités. Ils sont tous issus de la moelle osseuse et ont un devenir spécifique selon leur nature : les granulocytes et les non-granulocytes. La catégorie des granulocytes regroupe les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Les neutrophiles, largement plus abondants que les autres types de granulocytes chez les mammifères, sont spécialisés dans la phagocytose des bactéries et des levures (Delves *et al.*, 2017). Chez les oiseaux, les neutrophiles sont remplacés par des globules phagocytaires nommés hétérophiles (Jones, 2015). Les basophiles et les éosinophiles sont davantage adaptés à l'élimination des gros parasites comme les vers (Delves *et al.*, 2017). Finalement, les non-granulocytes regroupent les lymphocytes et les monocytes. Ces derniers sont en fait des précurseurs de macrophages, des cellules très performantes pour détecter les premiers signes d'une infection et pour initier la réponse immunitaire, en plus de pouvoir faire de la phagocytose extracellulaire (Abbas *et al.*, 2016). Les lymphocytes sont quant à eux les acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative (Coico et Sunshine 2015), troisième niveau de défense de l'organisme. L'immunité adaptative, ou acquise, se définit par son caractère hautement spécifique ainsi que par l'implication d'une mémoire immunitaire, qui prépare et améliore l'efficacité de la réponse immunitaire au fil des rencontres successives avec un pathogène spécifique (Coico et Sunshine 2015). Il existe deux catégories différentes, mais complémentaires à ce type de réponse : la médiation humorale (impliquant des lymphocytes B) et la médiation cellulaire (impliquant des lymphocytes T) (Delves *et al.*, 2017; Desforges *et al.*, 2016). Les lymphocytes sont des leucocytes non granuleux et sont d'ailleurs le seul type de globules blancs spécifiques à un antigène. Les précurseurs des deux types de lymphocytes se développent dans la moelle osseuse. Les lymphocytes T

migrent ensuite vers le thymus où ils mûrissent, alors que les lymphocytes B mûrissent entièrement dans la moelle osseuse (Coico et Sunshine 2015).

L'exposition à des substances toxiques comme les pesticides peuvent altérer plusieurs fonctions immunitaires comme la production de leucocytes (Christin *et al.*, 2004) et d'anticorps, ou encore, la mort de cellules et de tissus y étant impliqués (Blakley *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2010). Dans leur revue portant sur l'immunotoxicité des pesticides organophosphates, des chercheurs ont notamment soulevé que l'exposition chronique des rongeurs au diazinon entraînait une importante dégradation des organes lymphoïdes, comme la rate et le thymus, ainsi qu'une modification du ratio des différents lymphocytes à un degré suffisant pour compromettre la réponse immunitaire (Galloway et Handy 2003). Chez les abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.), l'exposition à des concentrations sublétales de néonicotinoïdes cause une baisse de concentration des hémocytes, ce qui entraîne une diminution de l'activité antimicrobienne de l'hémolymph (Brandt *et al.*, 2016). Les auteurs de cette étude ont d'ailleurs proposé que l'exposition aux pesticides rendait les abeilles plus susceptibles à des mites parasitiques (*Varroa destructor*), ce qui peut mener à la dégradation des colonies. Bien que certaines études menées sur des oiseaux aient montré que l'exposition aux pesticides peut entraîner une forme de réaction auto-immunitaire (Bishop *et al.*, 1998; Mayne *et al.*, 2004, 2005), une autre a montré que l'ingestion de semences traitées avec des néonicotinoïdes par les adultes avant la ponte peut entraîner une diminution de l'immunocompétence des jeunes (Lopez-Antia *et al.*, 2015).

Les fonctions immunitaires sont coûteuses à maintenir pour l'organisme (Sheldon et Verhulst 1996; Lochmiller et Deerenberg 2000; Norris et Evans 2000). Les altérations causées par l'exposition aux composés immunotoxiques forcent l'organisme à tenter de restaurer une fonction immunitaire normale, ce qui peut se faire au détriment de sa tolérance face aux pathogènes (Blakley *et al.*, 1999) ou d'autres fonctions, comme la croissance (Brommer 2004; Eisner Pryor et Casto 2015), la reproduction (Festa-Bianchet, 1989; Graham *et al.*, 2010; Mcnew *et al.*, 2020) et la survie (Nussey *et al.*, 2014).

1.1.4.2 Neurotoxicité

En plus des effets immunotoxiques des pesticides agricoles, certains, tels les carbamates, les organophosphates les pyréthroïdes et les néonicotinoïdes, sont reconnus comme ayant des effets neurotoxiques (Samuel *et al.*, 2007). La toxicité de ces insecticides est basée sur le fait qu'ils affectent le système nerveux des insectes visés, mais ils peuvent aussi avoir des effets létaux ou sublétaux sur la faune non visée.

Les carbamates et les organophosphates sont des inhibiteurs de cholinestérases, des enzymes impliquées dans la transmission des influx nerveux. Il existe deux types de cholinestérases : les acétylcholinestérases (AChE), les plus abondantes se trouvant dans les jonctions synaptiques et les érythrocytes, et les butyrylcholinestérases (BChE) (ou pseudoacétylcholinestérase ou acétylcholinestérase plasmatique) (Samuel *et al.*, 2007). Le rôle de l'AChE est de catalyser l'hydrolyse de l'acétylcholine, un neurotransmetteur, en choline et en acétate. L'acétylcholine a un effet excitateur lorsqu'elle est libérée dans les synapses des neurones et qu'elle s'attache à son récepteur postsynaptique. Elle est impliquée dans plusieurs processus du système nerveux central et autonome, appelés les voies cholinergiques (Mineau et Tucker 2002). Quant à la BChE, son rôle est moins clair, mais il semblerait qu'en plus de son rôle similaire à celui de l'AChE, qu'elle remplisse une fonction de protection contre les inhibiteurs de cholinestérase (Burgess *et al.* 1999; Mineau et Tucker 2002; Narváez *et al.* 2016). Pour que les influx nerveux fonctionnent bien, l'acétylcholine doit être rapidement hydrolysée par l'AChE. Les inhibiteurs d'AChE comme les organophosphates et les carbamates empêchent donc l'enzyme de faire son travail en s'y liant, ce qui entraîne une accumulation d'acétylcholine dans l'espace intersynaptique et une surstimulation du nerf ou du muscle receveur (Mineau et Tucker 2002). Ainsi, plus l'activité des cholinestérases est inhibée, plus les récepteurs cholinergiques sont excités (Samuel *et al.*, 2007). Parmi les conséquences de l'empoisonnement subléthal aux inhibiteurs d'AChE, on note le risque de détresse respiratoire, la faiblesse musculaire, les convulsions, la confusion, etc. (Mineau et Tucker 2002). Des oiseaux de proie fréquentant les champs agricoles et se nourrissant de proies contaminées ont notamment subi des empoisonnements parfois mortels à ces deux classes de pesticides (Mineau *et al.*, 1999; Trudeau *et al.*, 2007). Une étude menée dans des vergers

de l'Ontario, Canada, où des organophosphates ont été appliqués, a montré que les adultes de l'Hirondelle bicolor (*Tachycineta bicolor*) exposés diminuaient la fréquence de nourrissage de leurs jeunes (Bishop *et al.*, 2000). Les inhibiteurs des cholinestérases sont donc susceptibles d'affecter des comportements cruciaux comme l'approvisionnement.

Quant aux néonicotinoïdes et aux pyréthroïdes, leur neurotoxicité est due à leur affinité pour les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (ou aux récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique dans le cas des pyréthroïdes), auxquels ils se lient, causant une excitation continue du récepteur (Gibbons *et al.*, 2014). Ces familles d'insecticides ont été élaborées pour être moins toxiques pour les vertébrés que les carbamates et les organophosphates, puisque leur affinité est plus forte pour les récepteurs des insectes. Plusieurs études montrent toutefois qu'ils peuvent affecter la faune non ciblée, dont les oiseaux chez qui l'imidaclopride entraîne une anorexie et une désorientation qui peuvent nuire au comportement de migration (Eng *et al.*, 2017, 2019).

1.1.4.3 Limites des tests en laboratoire

Au Canada, l'homologation des pesticides est régie par l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire (ARLA) qui exige aux fabricants de fournir des études toxicologiques. Cependant, celles-ci ne sont pas toujours bien représentatives de la réalité en milieu naturel. D'abord, les protocoles utilisés dans les études en laboratoire exposent les organismes aux substances de manière aiguë, c'est-à-dire à de fortes concentrations sur de courtes périodes de temps, en général moins de 90 jours (Mineau, 2005). En revanche, en milieu naturel, les organismes sont le plus souvent exposés à de faibles concentrations, mais sur de longues périodes de temps, parfois toute leur vie. Cette exposition dite « modérée » et ses effets potentiels sont rarement testés en laboratoire (Figure 2). Les concentrations retrouvées en milieu naturel sont par ailleurs plus susceptibles d'avoir des effets sublétaux que de provoquer la mort de l'organisme (Bright *et al.* 2008; Köhler et Triebskorn 2013).

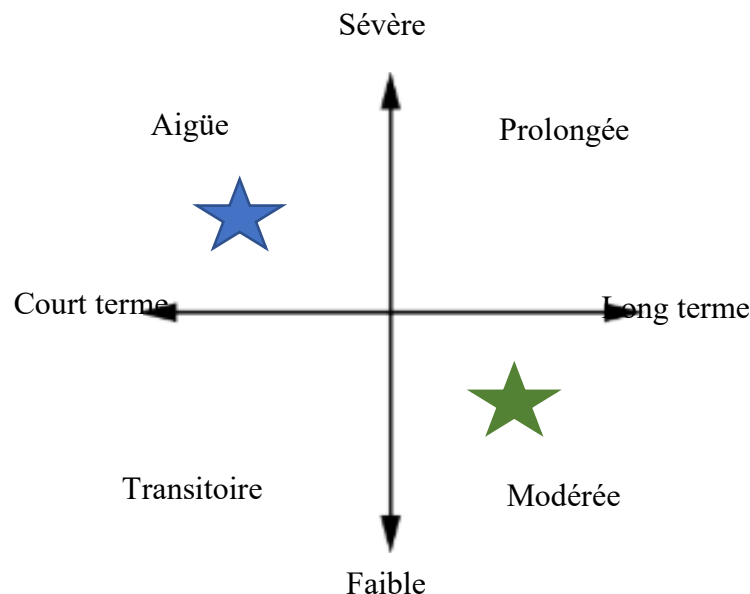


Figure 2 : Diagramme illustrant les différents types d'exposition à des substances toxiques, par exemple les pesticides.

L'axe horizontal représente la durée de l'exposition et l'axe vertical son intensité. L'étoile bleue représente l'exposition généralement testée en laboratoire et l'étoile verte l'exposition plus représentative des conditions auxquelles sont soumis les organismes en milieux naturels (Figure adaptée de Johnstone *et al.* 2012)

De plus, seule la toxicité des ingrédients actifs est testée, et non pas l'ensemble du produit commercialisé. Pourtant, des études ont montré que les formulants peuvent augmenter la toxicité des substances actives et même leur persistance dans l'environnement (revue par Cox et Sorgan 2006). Par exemple, l'exposition de têtards de ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*) à différentes formulations à base de l'herbicide glyphosate entraîne des altérations contrastées au niveau de l'épiderme et de la capacité respiratoire, ce qui laisse croire que l'effet est modulé par les formulants présents (Rissoli *et al.*, 2016).

De façon similaire, les effets cocktails potentiels, c'est-à-dire les interactions entre les produits, lorsque mélangés ensemble dans l'environnement, ne sont pas considérés dans les tests en laboratoire (Cedergreen, 2014; Hua et Relyea, 2014; Lebrun *et al.*, 2020). Des études ont pourtant mis en évidence que les mixtures de pesticides, à concentrations représentatives de ce qui est retrouvé dans l'environnement, peuvent avoir des effets

beaucoup plus marqués que l'exposition à un seul pesticide (Hayes *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2019).

Il reste donc difficile de prévoir les conséquences biologiques des substances utilisées comme pesticides en milieu agricole sur la faune sauvage, puisque l'assimilation, la métabolisation et les effets toxiques peuvent fortement varier d'une espèce à l'autre (Galloway et Handy 2003; Mineau et Palmer 2013). Les tests en laboratoire ne reflètent donc pas la complexité des conditions en milieu naturel (Blus et Henny, 1997; Holmstrup *et al.*, 2010), où les organismes peuvent être exposés à d'autres facteurs de pression, comme le parasitisme.

1.1.5 Parasitisme et ses effets

Un autre facteur pouvant influencer la physiologie des individus est l'exposition aux parasites (Sures, 2008). Un parasite est un organisme qui dépend d'un hôte pour survivre (Reece *et al.*, 2011), par exemple via le prélèvement de sang ou de tissus. Le rôle du système immunitaire est de défendre l'individu contre ce genre de pathogène, de manière à réduire les coûts en fitness pour l'hôte (Sheldon et Verhulst 1996; Owen *et al.* 2010). Tous les organismes vivants peuvent être affectés par le parasitisme, peu importe la complexité et l'efficacité de leur système immunitaire (Hedrick et Diego 2004). On distingue deux grands types de parasites : les endoparasites, qui vivent à l'intérieur de l'hôte (ex : vers, *Plasmodium* de la malaria), et les ectoparasites qui vivent à l'extérieur (ex : tiques, mites) (Reece *et al.*, 2011).

Alors que certaines études sur les endoparasites montrent une réponse immunitaire de l'hôte, par exemple l'augmentation de certains types de leucocytes (Dunn *et al.*, 2013; Rahkonen et Pasternack, 1998), d'autres n'ont pas trouvé d'évidences. Par exemple, dans une étude en milieu contrôlé portant sur des canaries (*Serinus canaria*), les chercheurs ont remarqué que les individus infectés par le parasite sanguin *Plasmodium* ne montraient pas d'augmentation de la production d'anticorps (Delhaye *et al.*, 2018).

La réaction immunitaire des hôtes face aux ectoparasites est quant à elle relativement peu étudiée. Dans le cas des hématophages qui s'attachent à l'hôte, la blessure occasionnée par l'attachement peut provoquer une réaction inflammatoire déclenchée par l'introduction d'antigènes (Owen *et al.*, 2010), qui mène notamment à l'afflux de globules blancs près de la plaie (Dusbábek *et al.*, 1988). Également, Owen et ses collaborateurs (2009) ont observé, chez des poules domestiques (*Gallus gallus domesticus*) parasitées par des acariens (*Ornithonyssus sylviarum*), une réaction inflammatoire aux sites affectés causée par l'afflux de leucocytes, ce qui menait également au développement d'une épaisse barrière sous-cutanée. Cette réaction empêchait l'accès au système sanguin indispensable aux parasites pour leur reproduction et diminuait ainsi l'intensité d'infestation sur les poules. L'attachement des parasites peut aussi introduire des antigènes spécifiques, qui déclenchent chez l'hôte une réaction immunitaire spécifique (King *et al.*, 2011). À l'inverse, des études proposent que le parasitisme par les hématophages réduise la réponse immunitaire, puisque ceux-ci limitent les ressources disponibles pour l'hôte (Christe *et al.*, 2000; Pitala *et al.*, 2009)

Les effets du parasitisme peuvent être plus ou moins dommageables pour l'organisme hôte, selon le type de parasite et l'intensité de l'infestation. Citons comme effets observés la diminution de la survie (Brown *et al.*, 1995; Møller *et al.*, 2009), la diminution de la condition corporelle (de Lope *et al.*, 1998), des changements comportementaux (Thomas et Shutler 2001; Hegemann *et al.* 2018) ou des changements dans l'immunocompétence de l'hôte (Dunn *et al.*, 2013; King *et al.*, 2011; Pitala *et al.*, 2010; Saino *et al.*, 1998). Dans des cas extrêmes, l'exposition au parasitisme peut occasionner la mort de l'hôte. Par exemple, l'infestation très élevée par des tiques d'hiver (*Dermacentor albipictus*) a causé la mort par anémie d'une grande proportion de jeunes orignaux (*Alces alces*) du Nord-Est des États-Unis entre 2014 et 2016 (Jones *et al.*, 2019). Chez les oiseaux nidicoles, les oisillons peuvent être exposés à un large éventail de parasites, dont les effets peuvent aller du retardement de la mue primaire (Pirrello *et al.*, 2015), au retard de croissance (Puchala, 2004), en passant par l'anémie (Simon *et al.*, 2005). Cependant, une étude a montré que les oisillons provenant de nids infestés de parasites investissent plus d'énergie dans leur croissance, une adaptation leur permettant de quitter le nid plus rapidement et ainsi limiter les effets négatifs du parasitisme (Saino *et al.*, 1998). Les parents peuvent par ailleurs

investir davantage dans le nourrissage des jeunes pour compenser la perte de nutriments engendrée par le parasitisme (Simon *et al.*, 2004). Dans d'autres études, les auteurs n'ont pas pu mesurer d'effets directs du parasitisme chez l'hôte (Thomas et Shutler 2001; Shutler *et al.* 2004; Taggart *et al.* 2018). Ces conclusions divergentes soulignent la complexité des relations hôte-parasite en milieu naturel.

En résumé, lorsque l'hôte est en santé et que les ressources sont suffisantes, la résistance aux parasites via la réponse immunitaire (Owen *et al.*, 2010) ou des mécanismes compensatoires (Hannam, 2006) sont généralement suffisants pour neutraliser, du moins en partie, ces effets. Cela devient néanmoins problématique dans un milieu contaminé par des substances toxiques qui interfèrent avec le bon fonctionnement des systèmes physiologiques (Martin *et al.*, 2010).

1.1.6 Effets combinés de l'exposition aux pesticides et aux parasites

Dans une revue publiée en 2017, Sures et ses collaborateurs font état d'une littérature grandissante sur les interactions entre les contaminants et les parasites présents dans l'environnement et les implications de ces interactions sur la santé des hôtes. Selon certains auteurs, le déclin global observé chez certains groupes taxonomiques dont on explique encore difficilement les causes, comme les amphibiens (Blaustein *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2010) et certains oiseaux (Rosenberg *et al.*, 2019; Spiller et Dettmers, 2019), pourrait découler de l'exposition à de multiples pressions. Il semble donc crucial de considérer l'exposition au parasitisme dans les études écotoxicologiques pour bien comprendre les effets des pesticides en milieu naturel (Marcogliese et Pietrock 2011; Sures *et al.* 2017). L'exposition combinée pourrait par exemple affecter la résistance de l'hôte aux pathogènes (Booton *et al.*, 2018; Marcogliese *et al.*, 2009), augmenter la prévalence et la densité des parasites (Gentes *et al.*, 2007) ou encore, avoir des effets synergiques délétères sur des processus physiologiques (Marcogliese *et al.*, 2010; Martenson *et al.*, 2017; Sures, 2008) et ce, à des concentrations sublétales de contaminants.

Dans une étude portant sur le ouaouaron, les auteurs ont montré que l'intensification agricole seule n'explique pas les effets sur le décompte différencié des leucocytes, mais que l'interaction entre le niveau d'intensification agricole et l'infection par un endoparasite spécifique (*Haematoloechus* sp) implique une augmentation marquée des monocytes et des granulocytes, des leucocytes impliqués dans la réponse immunitaire (Marcogliese *et al.*, 2009). Toutefois, le nombre de ces globules chute lorsque l'animal est sévèrement parasité, indiquant une réponse immunitaire déficiente. En contraste, Blonar et ses collaborateurs (2005) n'ont pas remarqué de lien similaire lors de leur étude en laboratoire portant sur l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*). Ils ont exposé des poissons à du toxaphène, un organochloré, et à des larves de cestodes parasitiques (*Diphyllbothrium dendriticum*). Ils ont observé que les individus parasités et exposés au toxaphène avaient un hémocrite et un nombre total de cellules sanguines plus faibles que les individus contrôles. Ils n'ont toutefois pas conclu à un effet synergique du parasitisme et du contaminant sur le système immunitaire, puisque le nombre de leucocytes restait inchangé entre les individus contrôles et ceux exposés au toxaphène. Ils soulèvent que les effets combinés de ces facteurs restent complexes et difficiles à comprendre et que plus d'études doivent être menées.

La majorité des études portant sur l'exposition combinée aux pesticides et aux parasites ont été menées chez des organismes aquatiques ou semi-aquatiques, et très peu chez des vertébrés terrestres comme les oiseaux. Pourtant, ceux-ci sont tout autant susceptibles d'être exposés à ces facteurs de pression multiples. Gentes et ses collaborateurs (2007) ont notamment montré que des Hirondelles bicolors nichant dans des sites pollués par l'exploitation des sables bitumineux en Alberta étaient plus sensibles au parasitisme par des larves de mouches du genre *Protocalliphora* (Diptères : Calliphores) que leurs semblables sur des sites de référence. En effet, les oisillons provenant des nids en milieux pollués étaient plus légers que ceux en milieux non pollués, à charge parasitaire équivalente. Les oisillons exposés uniquement aux parasites semblent ainsi capables d'investir suffisamment d'énergie pour maintenir une croissance normale, contrairement à ceux qui ingèrent des contaminants via leur alimentation. À l'inverse, une autre étude n'a pas trouvé d'effets combinés de l'exposition à des ectoparasites (*Protocalliphora*, *Ceratophyllus gallinae* et autres parasites), et à des polluants atmosphériques (c.-à-d. métaux lourds et oxydes sulfuriques) sur la croissance ou la survie des oisillons de Mésange

charbonnière (*Parus major*) et de Gobemouche noir (*Ficedula hypoleuca*) (Eeva *et al.*, 1994). Ils ont alors conclu que bien que les parasites puissent avoir des effets négatifs sur les oisillons, ceux-ci n'étaient pas amplifiés par l'exposition aux polluants.

Puisque les études s'intéressant aux effets combinés des contaminants et des parasites en milieu naturel sont peu nombreuses et mènent à des conclusions divergentes, notre compréhension des compromis physiologiques auxquels sont soumis les organismes qui doivent faire face à des pressions multiples en milieu naturel est limitée (Sures 2006, 2008; Marcogliese et Pietrock 2011). Dans un contexte où l'utilisation de pesticides est en augmentation, il est donc capital de bien comprendre les effets que ceux-ci peuvent avoir sur les organismes en milieu naturel, particulièrement chez des espèces en déclin.

1.2 Objectif et importance du projet

L'objectif de mon projet de maîtrise visait à vérifier les effets de l'exposition combinée aux pesticides agricoles et à des ectoparasites hématophages sur des traits physiologiques d'oisillons de l'Hirondelle bicolor. Je me suis intéressée à cinq marqueurs physiologiques : l'hématocrite, la capacité bactéricide du plasma contre *E. coli*, le nombre de granulocytes, le nombre de lymphocytes ainsi que le nombre de monocytes. Ces marqueurs ont été choisis parce qu'ils sont considérés comme étant de bons indicateurs de la performance physiologique et de l'immunocompétence chez les oiseaux (Boughton *et al.*, 2011; Matson *et al.*, 2006; Norte *et al.*, 2009). L'hématocrite, ou pourcentage de globules rouges, est un marqueur de performance physiologique intéressant puisqu'il reflète la capacité aérobie de l'individu, particulièrement important chez les jeunes en croissance et à l'envol (Puerta *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 2007). J'ai également considéré des marqueurs issus des deux composantes du système immunitaire, l'immunité innée et celle adaptative. La capacité bactéricide fait partie de la réponse innée et mesure la capacité qu'a le plasma de l'individu à limiter une infection bactérienne (Matson *et al.*, 2006; Stambaugh *et al.*, 2011; Tieleman *et al.*, 2010) à travers divers mécanismes comme les anticorps naturels, le système du complément et les lysozymes. Finalement, les leucocytes sont liés aux deux composantes du système immunitaire : les granulocytes et les monocytes

font partie de la réponse innée et sont donc non-spécifiques à un pathogène, alors que les lymphocytes sont hautement spécifiques et sont impliqués dans la réponse adaptative (Coico et Sunshine, 2015).

Comme pour la majorité des insectivores aériens, les effectifs de l'Hirondelle bicolore sont en déclin marqué depuis les années 1970, particulièrement dans le Nord-Est de l'Amérique du Nord (Michel *et al.*, 2016). Bien que l'intensification agricole et l'utilisation accrue de pesticides qui en découle soient soupçonnées de participer à ce déclin, les mécanismes impliqués sont encore mal compris. Mon projet contribue ainsi à une meilleure compréhension du rôle des pesticides dans le déclin des insectivores aériens, en intégrant la notion d'exposition à des facteurs de pression multiples. Cette étude est effet parmi les premières à s'intéresser aux effets de l'exposition combinée aux pesticides et aux parasites sur les oiseaux.

Cette étude contribuera également aux connaissances en écotoxicologie des pesticides, puisque je m'intéresse aux effets sublétaux en milieu naturel, effets souvent évalués inadéquatement dans les études en laboratoire. Une méthode novatrice pour évaluer directement les pesticides ingérés par les oisillons via les insectes rapportés au nid par les parents a été utilisée (Haroune *et al.*, 2015). Mon projet s'insère donc à la frontière entre l'écotoxicologie et l'écophysiologie, tout en intégrant les grandes lignes d'un domaine récent, la parasitologie environnementale (Sures *et al.*, 2017).

1.3 Méthodologie générale

1.3.1 Modèle d'étude

L'Hirondelle bicolore est un petit passereau migrateur (~ 20 grammes) nichant en Amérique du Nord (Knight *et al.*, 2018) et faisant partie du groupe des insectivores aériens. Elle niche principalement dans des milieux ouverts et est fréquemment retrouvée dans les champs agricoles et près des milieux humides. C'est une utilisatrice secondaire de cavités qui s'accommode bien des nichoirs artificiels, ce qui en fait une espèce facile à étudier

(Winkler *et al.*, 2011). Elle est de plus peu sensible au dérangement, il est donc aisé de manipuler les adultes et les oisillons sans craindre un abandon de nichée. Ces caractéristiques font de l'Hirondelle bicolore un modèle de choix pour mon étude (Jones, 2003).



Figure 3 : Jeune Hirondelle bicolore âgée d'environ 2 jours (A; ©Audrey Sigouin). Larve de *Protocalliphora* fixée sur un oisillon (B; ©Noémie Pelletier)

La femelle pond 5 à 6 œufs en moyenne, qu'elle incube pour une période d'environ 12 à 14 jours (Robertson *et al.* 1992). L'éclosion des jeunes a lieu entre mai et juin et ils restent au nid entre 18 et 22 jours avant l'envol (Figure 3A). Pendant cette période, les parents assurent le nourrissage grâce à des insectes chassés dans les environs. Ces proies sont susceptibles d'être contaminées par des pesticides (Haroune *et al.*, 2015), particulièrement puisqu'une grande proportion de la diète est composée d'insectes ayant un stade de vie aquatique (Bellavance *et al.*, 2018) et que les cours d'eau en milieux agricoles sont largement contaminés (Giroux, 2019; Montiel-León *et al.*, 2019).

Les nids d'oiseaux nidicoles comme les Hirondelles bicolores sont très souvent parasités par des larves de mouches du genre *Protocalliphora* (Bennett et Whitworth 1991). Les femelles adultes de ce parasite pondent leurs œufs dans des nids contenant des oisillons et,

une fois les larves écloses, elles se fixent aux oisillons la nuit pour se nourrir de sang puis se cachent dans le matériel de nidification le jour (Figure 3B). Les larves ont besoin d'environ trois à quatre repas de sang pour compléter leur cycle larvaire, qui dure généralement de 7 à 15 jours. Elles forment ensuite des pupes, desquelles l'adulte émerge au bout de quelques semaines (Sabrosky *et al.*, 1989).

1.3.2 Aire d'étude

Depuis 2004, une population d'Hirondelle bicolore du Sud du Québec est suivie chaque saison de reproduction. Le système d'étude est constitué de 400 nichoirs installés sur 40 fermes réparties sur une superficie d'environ 10 200 km² à travers l'Estrie et la Montérégie (Ghilain et Bélisle 2008). Ces fermes suivent un gradient d'intensification agricole : à l'est, on retrouve de petites exploitations extensives avec des prairies, pâturages et fourrages, alors qu'à l'ouest dominant les grandes exploitations laitières et les monocultures de maïs et de soya. Cette disposition reflète également un gradient d'intensité d'utilisation de pesticides, puisqu'on détecte davantage de pesticides dans les exploitations intensives par rapport à celles extensives (Poisson, 2019).

Dans le cadre de mon projet, j'ai utilisé un sous-échantillon de 10 fermes situées aux extrêmes de ce gradient, pour un total de 100 nichoirs. J'ai utilisé les années 2013, 2014 et 2015, puisque c'est pendant cette période qu'ont été récoltés les données physiologiques et les boli d'insectes destinés à mesurer la contamination de la nourriture des Hirondelles par des pesticides.

CHAPITRE 2

PESTICIDES AGRICOLES ET PARASITES: POSSIBLES EFFETS COMBINÉS SUR LA PHYSIOLOGIE D'UN INSECTIVORE AÉRIEN EN DÉCLIN

2.1 Introduction de l'article

Cet article vise à déterminer si l'exposition combinée à des pesticides agricoles et à des ectoparasites hématophages (*Protocalliphora*) entraîne des effets additifs ou synergiques sur des marqueurs physiologiques des oisillons de l'Hirondelle bicolore. Des études, notamment sur des amphibiens, montrent que l'exposition combinée à de multiples pressions environnementales peut entraîner des effets délétères sur la physiologie, mais cela a été peu considéré chez des vertébrés terrestres comme les oiseaux. Nous avons donc quantifié les effets d'une cinquantaine de pesticides et des *Protocalliphora*, ainsi que leurs effets combinés, sur l'hématocrite, le BKA et le décompte différentiel des leucocytes des oisillons au nid. Cette étude contribue à une meilleure compréhension des effets des pesticides sur la faune en milieu naturel et montre également l'importance de considérer plusieurs pressions potentielles lors d'études écotoxicologiques. J'ai pu utiliser les données physiologiques amassées sur le terrain par les étudiant•e•s entre 2013 et 2015. Les manipulations en laboratoire pour le BKA ont été effectuées par Clarence Schmitt et j'ai personnellement fait le décompte des leucocytes. J'ai également participé à la collecte de données relatives au suivi de la population d'hirondelles ciblée au sein de celui-ci lors des étés 2018 et 2019, ainsi qu'à la formation et la supervision des stagiaires dans ce contexte. J'ai effectué l'ensemble des analyses statistiques pour cet article, ainsi que la rédaction de la première version. Ma directrice, la Pre. Fanie Pelletier, et mon codirecteur, le Pr. Marc Bélisle, ont agi comme conseillers et ont apporté leurs commentaires sur le manuscrit. Le Pr. Dany Garant a également participé à l'amélioration de ce manuscrit par ses commentaires. Cet article sera soumis à la revue *Conservation physiology* à l'été 2020.

Agricultural pesticides and parasites: possible combined effects on physiology of a declining aerial insectivore

Par

Audrey Sigouin, Marc Bélisle, Dany Garant et Fanie Pelletier

2.2 Abstract

Over the past 60 years, the use of agricultural pesticides has been increasing worldwide. As these compounds have been developed to disrupt the physiology of pest species and their specificity is limited, they can also have adverse effects on non-targeted animals. Recent studies have also shown that adverse toxicological effects due to pesticides can be amplified in otherwise stressful environments. Yet, only a few studies have documented their effects in natural settings where organisms are exposed simultaneously to pesticides and other environmental pressures such as parasites. To assess potential combined effects of pesticides and hematophagous parasites on the physiology of free-ranging wildlife, we measured hematocrit, bacteria-killing ability (BKA) and leucocyte counts in nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*), a declining aerial insectivore, in southern Québec, Canada, between 2013 and 2015. Our results show that combined exposition to pesticides and hematophagous *Protocalliphora* larvae has a negative effect on hematocrit, highlighting possible synergic effects. However, we found no such effects on BKA and leucocyte counts, which underlines the complexity of physiological responses to pressures in natural settings. Populations of several aerial insectivores are declining, and while sublethal effects of pesticides on physiology are suspected, our results suggest that exposition to other factors, such as parasitism, should also be considered to correctly assess these effects, especially in a context where pesticides are increasingly present in the environment.

Key words: Pesticides, *Protocalliphora* sp., tree swallow, farmlands, ecotoxicology

2.3 Introduction

Human activities increasingly affect natural environments. One important human-driven environmental change is the intensification of agricultural practices. Over the past decades, conversion of grasslands into row crops monocultures, simpler crop rotation, as well as increased use of machinery and agrochemicals, led to the simplification and homogenization of agricultural landscapes in many countries (Benton *et al.* 2003; Stanton *et al.* 2018). As a result, a wide range of species found in agricultural areas, including insects (Hallmann *et al.*, 2017; Wagner, 2019), amphibians (Stuart *et al.*, 2004) and birds (Hallmann *et al.*, 2014; Murphy, 2003; Rosenberg *et al.*, 2019), are declining worldwide. The drivers of those declines are often complex, but the increased use of pesticides has been hypothesized to play a crucial role. In Europe and North America, several studies suggest that sharp declines of farmland bird populations could be attributed to decreases in abundance of their insect prey (Benton *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 1997; Hart *et al.*, 2006; Møller, 2019; Stanton *et al.*, 2018) and to direct toxic effects of pesticides (Donald *et al.*, 2001, 2006; Mineau and Whiteside, 2013; Spiller and Dettmers, 2019; Stanton *et al.*, 2018). As pesticides developed for agricultural purposes are increasingly toxic and tend to accumulate in the environment (Dibartolomeis *et al.*, 2019), there is an urgent need to further assess their effects on wildlife (Gibbons *et al.*, 2014; Pisa *et al.*, 2014).

Pesticides are designed to be toxic for pests. Their toxicity, however, generally stems from the disruption of basic cellular and physiological processes shared by many taxa (Gibbons *et al.*, 2014; Zaller and Brühl, 2019). Therefore, the specificity of pesticides is limited and these substances can also affect non-targeted wildlife. Although there have been reports of lethal toxicity of pesticides on wildlife due to acute exposition (Kwon *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2019), current interest lies in the sublethal effects of these substances through chronic exposure (Bright *et al.*, 2008; Köhler and Triebkorn, 2013). For instance, carbamate and organophosphate insecticides are designed to alter acetylcholinesterase, an enzyme that regulates nervous influx transmission, which leads to the death of insects, but can also affect any exposed animal (Bishop *et al.*, 2000; Burgess *et al.*, 1999; Mineau and Tucker, 2002). Analogously, neonicotinoid insecticides, which bind to acetylcholine receptors and

thereby disrupt nervous influx regulation, were shown to affect physiological and behavioral processes of birds with impacts on their immunity, reproduction and migration (Eng *et al.*, 2017, 2019; Lopez-Antia *et al.*, 2015a). Atrazine, one of the most widely used herbicides worldwide (Solomon *et al.*, 1996), was shown to have negative effects on amphibian and fish immunity, including a reduction in leucocyte numbers and the atrophy of lymphoid organs (reviewed in Rohr and McCoy 2010).

A major limitation to our understanding of toxicological effects of pesticides on wildlife is that most studies are conducted under controlled laboratory conditions that are not representative of environmental conditions. For example, laboratory assays usually consider the toxicity of high concentrations of active ingredients over short time periods (generally 30 days and up to 90 days maximum), whereas long-term exposure to low concentrations is more typical of natural settings (Cox and Sorgan, 2006; Mineau, 2005). Laboratory studies also generally focus on the effects of a single active ingredient and thus rarely consider the effects resulting from the usual simultaneous exposure to multiple compounds (i.e., active agents or additives) that can act additively or in synergy (Cedergreen, 2014; Hua and Relyea, 2014; Lebrun *et al.*, 2020). For example, atrazine is known to amplify the toxicity of other pesticides such as organophosphates (Belden and Lydy, 2000). In light of those limitations, it is thus essential to conduct more studies in natural systems to better understand pesticides effects on wildlife (Brühl and Zaller, 2019; Mineau and Palmer, 2013).

Similarly, simplified assays performed under controlled conditions do not consider complex interactions with other environmental pressures (Blus and Henny, 1997; Holmstrup *et al.*, 2010). Yet, organisms that are exposed to multiple pressures (natural and/or anthropogenic) could suffer stronger negative effects than if exposed to a single one (Holmstrup *et al.*, 2010; Marcogliese and Pietrock, 2011). While pesticides can have detrimental effects on their own, a growing body of literature highlight the importance of considering multiple environmental pressures, such as pathogens and parasites, to correctly assess contaminant effects (Marcogliese and Pietrock, 2011; Sures *et al.*, 2017). Combined exposition to pesticides and parasites could indeed impair the immune reaction of hosts toward pathogens (Booton *et al.*, 2018; Coors *et al.*, 2008; Marcogliese *et al.*, 2009),

enhance parasite prevalence (Gentes *et al.*, 2007) or lead to synergic negative effects on physiological processes (Sures 2008; Marcogliese *et al.* 2010; Marteinson *et al.* 2017). Most studies to date have been conducted on aquatic (*Salvelinus alpinus*, Blonar *et al.*, 2005; *Perca flavescens*, Marcogliese *et al.*, 2010) or semi-aquatic (*Lithobates catesbeianus*, King *et al.*, 2010; Marcogliese *et al.*, 2009) species and very few have been conducted on terrestrial vertebrates, such as birds (but see Eeva *et al.*, 1994; Gentes *et al.*, 2007; Marteinson *et al.*, 2017). A better understanding of combined effects of a variety of environmental pressures on physiology is thus needed and may prove especially important to identify the causes underlying population declines, such as in amphibians (Blaustein *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2010) and in many avian species (Rosenberg *et al.*, 2019; Spiller and Dettmers, 2019).

The lack of ecotoxicological field studies that have considered the combined effects of both pesticides and parasites likely stems from the scarcity of population studies where exposures and responses to such multiple pressures have been monitored for marked individuals through time or across multiple sites. The goal of this study was to partially fill that gap by investigating the combined effects of agricultural pesticides and an ectoparasite in tree swallow (*Tachycineta bicolor*) nestlings born on 10 farms between 2013 and 2015. Similar to other aerial insectivore populations, tree swallows are declining in north-eastern North America (Michel *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2015). Although agricultural intensification is hypothesized to play a role in these declines, specific drivers and mechanisms are still poorly understood. Tree swallow nestlings, like most altricial birds, are often affected by several parasites, including hematophagous *Protocalliphora* fly larvae (Bennett and Whitworth, 1991). Although several studies reported negative effects of *Protocalliphora* on nestling physiology (Sabrosky *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2007; Whitworth and Bennett, 1992), others found little or no effect of these ectoparasites (Hannam, 2006; Howe, 1992). Studies of direct effects of pesticides on immunity of free-ranging passerine birds remain limited. Bishop *et al.* (1998) found that tree swallows nesting in orchards in Ontario, Canada and exposed to pesticides had decreased hematocrit but showed enhanced immune response, pointing out possible autoimmune reaction (see also Mayne *et al.*, 2004, 2005).

To assess combined effects on physiological components of tree swallow nestlings, we used five markers: bacterial-killing ability (BKA), differential leucocyte counts (including granulocytes, lymphocytes and monocytes) and hematocrit (% of red blood cells). These markers were chosen because they have previously been shown to be good indicators of physiological performance and immunocompetence in birds (Boughton *et al.*, 2011; Matson *et al.*, 2006; Norte *et al.*, 2009). We selected markers that characterize several components of the immune system, because wildlife is generally exposed to different types of pathogens (Lochmiller and Deerenberg, 2000; Sheldon and Verhulst, 1996). BKA is a measure of innate capacity of the individual's blood or plasma to limit bacterial infection (Matson *et al.*, 2006; Stambaugh *et al.*, 2011; Tieleman *et al.*, 2010) and implies different defense mechanisms like natural antibodies, the complement system and cellular lysis through lysozyme activity. Leucocyte counts are related to both innate and adaptative mechanisms: granulocytes and monocytes are part of the innate system and are therefore part of non-specific reaction to a pathogen, whereas lymphocytes are implied in adaptative responses to specific pathogens (Coico and Sunshine, 2015). Finally, hematocrit, is linked to an individual's physiological performance and is especially important during nestling growth and just after its fledging when oxygen uptake is important (Puerta *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 2007), and can be affected by both exposure to pesticides (Lopez-Antia *et al.*, 2015b; Singla and Sandhu, 2015) and hematophagous ectoparasites (Simon *et al.*, 2005; Whitworth and Bennett, 1992). Previous research in our study system showed that immune response of tree swallows was affected by landscape habitat composition linked to agricultural intensification (Pigeon *et al.*, 2013b, 2013a; Schmitt *et al.*, 2017), thus suggesting a possible impact of pesticides on such markers. These studies, however, did not further investigate this possibility.

We hypothesized that exposure to pesticides and hematophagous ectoparasites should have additive or synergic effects on physiological markers of tree swallow nestlings. Because physiological homeostasis is costly to maintain, nestlings would not be able to cope efficiently with both the toxic effects of pesticides and the consequences of parasitism. We therefore predicted that the combined exposure should decrease BKA, leucocyte counts and hematocrit of nestlings. Decreased physiological performance could ultimately affect the growth and survival of nestlings, but this was not investigated in the present study.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Study area and population

Tree swallow is a migratory aerial insectivorous passerine that breeds over most of North America. Nestlings of a given clutch usually hatch within a 24-h period (Quinney *et al.*, 1986) after about 12 days of incubation and fledge at 20-22 days of age (Winkler *et al.*, 2011).

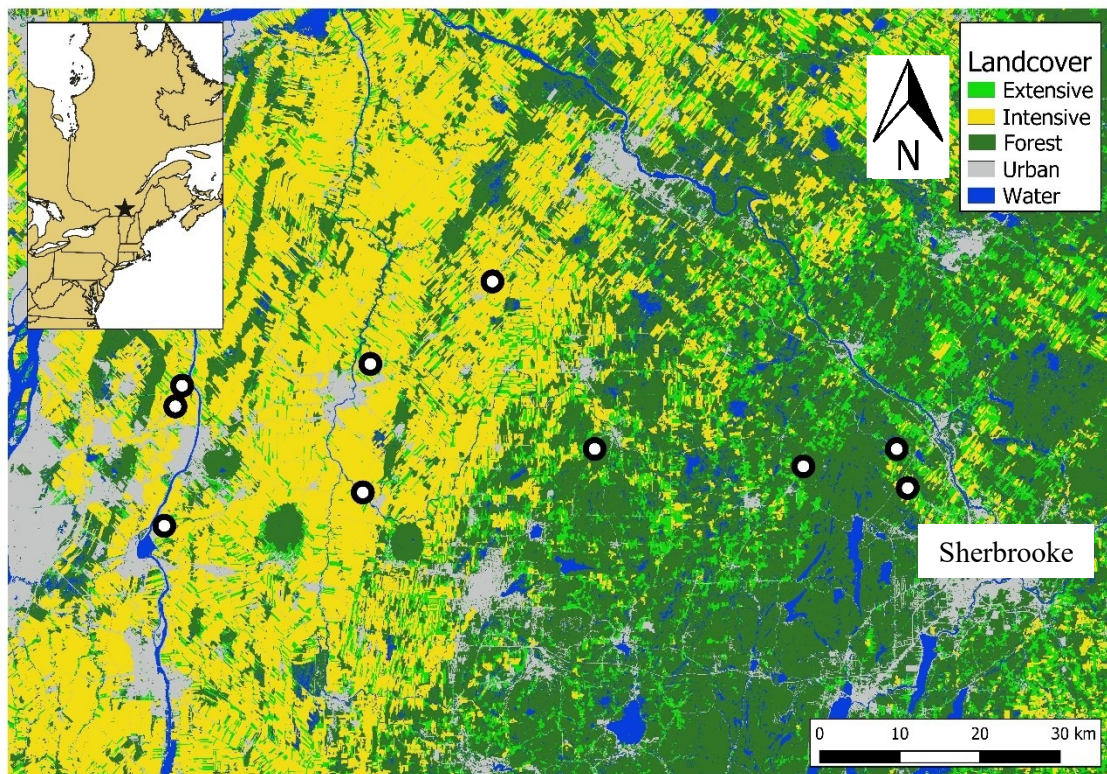


Figure 4 : Map of study system in southern Québec, Canada.

The top left box illustrates the location (star) of our study system in Québec. The 10 farms considered in this study are represented by the white dots. “Extensive” and “intensive” refer to agricultural practices and culture type.

The current study capitalizes on the long-term monitoring of a population of tree swallows in southern Québec, Canada. Each year since 2004, the breeding activities of tree swallows are monitored over a network of 400 nest boxes distributed equally among 40 farms across

an area of 10,200 km² (Ghilain and Bélisle, 2008). In 2013, 2014 and 2015, we monitored physiological markers for a subsample of 100 nest boxes on 10 farms: 4 of which were located in extensively cultivated environments and 6 in intensively cultivated environments (Figure 4). These farms are distributed along an east-west agricultural intensification gradient, with extensive crops (i.e., hayfields, forage crops and pastures) dominating in the east and intensive row crops (i.e., monocultures of corn, soybeans and other cereals) in the west. Intensive landscapes of our study area are known to be poorer habitats for breeding tree swallows and may negatively affect the fitness of these birds (Ghilain and Bélisle, 2008) through lower prey (flying insects) availability (Bellavance *et al.*, 2018; Rioux Paquette *et al.*, 2013) and greater pesticide use (Giroux, 2019; Montiel-León *et al.*, 2019; Poisson, 2019). Nest boxes are monitored every two days from the arrival of the adults (end of April) until all nestlings have fledged (end of July).

2.4.2 Bolus collection and pesticide analysis

To assess the exposure of nestlings to pesticides via their diet, we collected boluses of insects brought by the parents to the nest following Bellavance *et al.* (2018). The boluses were collected from nestlings aged 6, 8 and 10 days for 2 consecutive 30-min sessions for a total period of 1 hour. Collection was stopped when we obtained a total of 5 boluses for a specific nest box and or a total of 10 boluses for a farm. Boluses were kept in sterile Falcon® tubes on ice for the day (< 12 h) and then transferred in a small freezer at the end of the day for a maximum of one week before being stored at -80 C° until laboratory analysis.

We used a microwave-assisted solvent extraction and a salt-out effect method (Haroune *et al.*, 2015) to determine the presence and concentration of 51 pesticides and 3 of their derivatives (hereafter referred to as pesticides for simplicity) in insect boluses. Compounds were determined using ultra-high pressure liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS, see Haroune *et al.* 2015 for details). The list of pesticides we considered included a diversity of chemical classes and modes of toxicity, and comprised 9 fungicides, 18 herbicides and 24 insecticides [10 organophosphates, 7

carbamates (+3 derivatives) and 7 neonicotinoids; see Table S1 for a detailed list of compounds and their respective detection and quantification limits]. These pesticides are used or have been used in the recent past within our study area (Giroux, 2019; Montiel-León *et al.*, 2019) and are known to have adverse effects on animals (Blakley *et al.*, 1999; Galloway and Handy, 2003; Gibbons *et al.*, 2014; Köhler and Triebkorn, 2013).

2.4.3 Parasite quantification

Protocalliphora is a genus of calliphorid flies (Diptera, Calliphoridae) with a parasitic hematophagous larval stage that are very common in altricial bird nests (Sabrosky *et al.*, 1989). Adults emerge from pupae after 14-21 days (Bennett and Whitworth, 1991), leaving empty shells (puparia) in the host birds' nest. Each early fall, the nests of occupied nest boxes, as well as their content, were carefully collected, placed in plastic bags and stored at 4 C° until further processing within a few weeks. Nests were placed at -80 C° the day prior to nest sorting to kill parasites. Nests were weighed (± 0.01 g) (P-2002, Denver instrument, Bohemia, NY, USA) and the nest material sorted under a ventilated hood to collect *Protocalliphora* pupae and empty puparia. Pupae and puparia were counted for each nest and preserved in 75 % ethanol. A previous study determined that *Protocalliphora sialia* was the dominant species in our nest box system (96.5 % and 87.6 % of infested swallow nests in 2008 and 2009, respectively), but that *Protocalliphora metallica* and *Protocalliphora bennetti* also parasitized swallow nests (Daoust *et al.*, 2012). As we did not identify pupae and puparia to the species level for this study, all specimens were lumped under *Protocalliphora* spp, hereafter named *Protocalliphora*.

2.4.4 Blood sampling and hematocrit measure

We collected ca. 50 μ L of blood from the left brachial vein of 8-day-old nestlings using heparinized capillary tubes. Approximately 5 μ L of this blood was used for blood smears (see below) and 30 μ L was dried on filter paper for DNA sex determination

(Porlier *et al.*, 2009). Capillaries containing the remaining blood were kept on ice and then centrifuged for 7 min at 14,500 g (LWS M24 Hematocrit Centrifuge, LW Scientific, Lawrenceville, GA, USA). Hematocrit was measured from the height of packed red cells and the total height of the blood column in the capillary tube with a caliper to the nearest mm. These measures were taken twice and then averaged. The plasma was then pipetted and stored in microtubes at 4 C° for up to 8 hours and frozen at -80 C° for up to 2 months prior to the BKA assays. Additional blood was subsequently sampled in part of the nestlings for other purposes not discussed in this study, and hematocrit was therefore measured again for those individuals.

2.4.5 Bacterial killing ability (BKA) assays

We assessed the BKA of nestling plasma against *E. coli* with a modified version of the protocol of Morrison *et al.* (2009). *E. coli* cultures (ATCC 8739) were reconstituted and diluted in tryptic soy broth (TSB) solutions. We added 20 mL of this solution to 95 mL of cell culture medium and 5 mL of a nestling's plasma before incubating at 40 C° for 45 min. A volume of 50 µL was then plated on duplicate TSB agars incubated at 40 C° for 24 h before counting colony forming units (CFUs). A negative control without nestling plasma was plated and incubated the same way. A BKA score was calculated for each nestling as [(average no. surviving CFUs on plasma treated plates / average no. CFUs on the control plates) * 100]. See Schmitt *et al.* (2017) for more details on assays.

2.4.6 Leucocytes counts

We smeared 5 µL of blood from 8-day-old nestlings on microscope slides which were then air-dried and colored in the laboratory with DipQuick stain (DipQuick Jovet, CDMV). Slides were then observed with a microscope (Zeiss Axio Observer Z) under a 63x oil-free ocular until 100 leucocytes were differentially counted (lymphocytes, monocytes and granulocytes). Because heterophils, eosinophils and basophils were difficult to

differentiate under such coloration, they were all considered as granulocytes (Johnstone *et al.*, 2012). Although we obtained blood smears for all nestlings, we randomly selected samples from only 2 nestlings per brood for leucocyte counts. We also excluded data from 4 of the 230 sampled individuals because they showed a remarkably small proportion of lymphocytes (<5 %) relatively to the rest of the nestlings.

2.4.7 Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using a two-step approach. First, we used a multivariate analysis to assess the correlations between physiological measures and investigate potential similarities among physiological profile of nestlings. Second, we used univariate analyses on each physiological marker to test for pesticide and parasite effects and their interaction while controlling for other factors.

2.4.7.1 Multivariate analyses

Given the closed data structure of the leucocyte counts that summed up to 100 %, we ran a compositional principal component analysis (PCA; Filzmoser *et al.* 2009) with the function `pcaCoDa` within the `robCompositions` R package (Hron *et al.*, 2010). This function allows the inclusion of both compositional (number of lymphocytes, monocytes and granulocytes) and non-compositional (BKA and hematocrit) data into a single PCA. To reduce variation in hematocrit values due to nestling age, we restricted the age window for this measurement to 7, 8 and 9 days (i.e., the age of nestlings at BKA and leucocyte sampling \pm 1 day), for a total of 121 nestlings considered in this analysis. We also added the number of insect boluses contaminated at the farm scale and number of *Protocalliphora* in the nest as non-compositional data to assess potential correlations with physiological markers. Because BKA values were not normally distributed, we used the following transformation prior to analysis: $-\sqrt{1 - \text{BKA}}$ (Legendre and Legendre, 1998; Pigeon *et al.*, 2013b). Non-compositional data was standardized (zero mean, unit variance), while the

pcaCoDa function automatically applies an isometric log-ratio transformation to compositional data (Hron *et al.*, 2010). The results from this analysis must be considered as exploratory, as the hierarchical structure of the data could not be taken into account.

2.4.7.2 Univariate analyses

We fitted separate models for each marker. Nest boxes being nested within farms in our system, we first included nest box and farm identify as random effects to account for the non-independence of observations and hierarchical structure of the data (Bolker *et al.*, 2009). However, for BKA and leucocyte counts, the addition of any of the random effects explained little variance (<0.01 % of total variance) in the response variable and created singular fit problems. Random effects were thus discarded from final model fitting. Nested random effects of nest boxes within farms were thus only retained for hematocrit.

Because hematocrit was measured repeatedly between days 7 and 19 for many nestlings, we restricted the age window to 7 to 12 days and controlled for nestling age in all models to minimize remaining noise related to this variable. We kept only one randomly selected measure per nestling within this age window (out of 2 measures for 166 nestlings) to avoid the use of an additional random effect (i.e., nestling identity) since we were not aiming to investigate within individual variation of this marker. To ensure that this random selection did not create structure in the data, we reran our best model 50 times, randomly selecting a new measure per nestling for each iteration (histogram of the estimates of the model and confidence intervals can be found in Figure S1). We fitted the ratio of red blood cells to total blood volume collected as a response variable in a linear mixed-effect model because hematocrit values were weakly correlated with total blood volume ($r = -0.13$; Figure S2) and total volume was not correlated with any of the explanatory variables (Brett, 2004). For BKA, we used generalized linear models with a binomial distribution and logit link function. Since 57 % of the nestlings showed negative BKA values, we proceeded as Schmitt *et al.* (2017) and categorized BKA into 0 and 1 for values ≤ 0 and > 0 , respectively. Finally, as leucocyte data was overdispersed, we used generalized linear models with a negative binomial distribution and log link function to model each type of leucocytes

separately. A summary of our statistical approach and sample size for each marker can be found in Table S2.

We calculated a proxy of pesticide exposure through the diet using the number of insect boluses contaminated by at least one pesticide for each farm. In candidate models including this variable, we also included the total number of boluses collected on the farm to account for differences in pesticide detection probabilities among farms. We estimated parasite loads per nestling through the sum of *Protocalliphora* pupae and puparia found in each nest while controlling for the number of nestlings in the nest upon hatching. We assessed potential combined effects of pesticide exposure and parasite load by including their interaction in some candidate models.

Finally, we included additional control variables known to possibly affect physiological markers in some models. These included year (as factor), sex (male or female) and the percent of extensive cultures in a 500-m radius around the nest box as a proxy of prey availability (Bellavance *et al.*, 2018; Rioux Paquette *et al.*, 2013). Nestling age was included only in hematocrit models as other markers were measured at the same age (i.e., 8 ± 1 -day-old). We did not include nestling mass in final models because it was highly correlated with age ($r = 0.81$; variance inflation factor = 3.2) and had no effect on any markers. All numeric explanatory variables were standardized to zero mean and unit variance.

We established a list of candidate models for each marker (See S3-S7). A final model was selected for each marker based on the second-order Akaike information criterion (AICc) with the AICcmodavg R package (Mazerolle 2019). Although we present and discuss estimates only for the best models (i.e., with $\Delta\text{AICc} < 2$), we show model-averaged predictions and their 95 % unconditional confidence intervals while fixing non-focal, numeric explanatory variables at their mean. Conformity of models to normality and homoscedasticity was assessed visually with the DHARMA R package (Hartig, 2019).

2.5 Results

Sample size differed among physiological markers because we did not have enough blood to make all measurements for some nestlings. We hence could determine hematocrit for 513 nestlings (2013: 128; 2014: 210; 2015: 175), BKA for 507 nestlings (2013: 116; 2014: 201; 2015: 190), and leucocyte counts for 226 nestlings (2013: 46; 2014: 105; 2015: 75), all of which were distributed among a total of 133 broods. Prevalence of these nests infested by *Protocalliphora* was 56 % (2013: 57 %; 2014: 55 %; 2015: 57 %) and the mean number (\pm SD) of parasites (pupae and puparia) per nest was 8.0 ± 12.6 (median = 2; range: 0-59) (2013: 5.7 ± 7.7 ; 2014: 9.3 ± 15.0 ; 2015: 8.5 ± 13.1), for an average of 1.8 ± 2.8 *Protocalliphora* per nestling (2013: 1.5 ± 1.8 ; 2014: 2.0 ± 3.2 ; 2015: 1.9 ± 3.9).

2.5.1 Multivariate analysis

The PCA biplots did not reveal any clear cluster of points that would have suggested that nestlings showed specific physiological profiles according to their relative exposure to pesticides as measured by the proportion of boluses contaminated at the farm scale (Figure 5). Most of the variance (82 %) was explained by the first three components. Nestling physiology varied mostly according to hematocrit and BKA as these variables had relatively high loadings on PC1 (hematocrit: 0.50; BKA: -0.83) and PC2 (hematocrit: -0.86; BKA: -0.48). Nestlings also distinguished themselves based on their opposite numbers of lymphocytes (0.62) and monocytes (-0.74), which had high loadings on PC3. This being said, and aside of the two latter leucocyte counts, the PCA indicated that physiological responses were relatively uncorrelated to one another and that univariate analyses of the different markers were thus warranted.

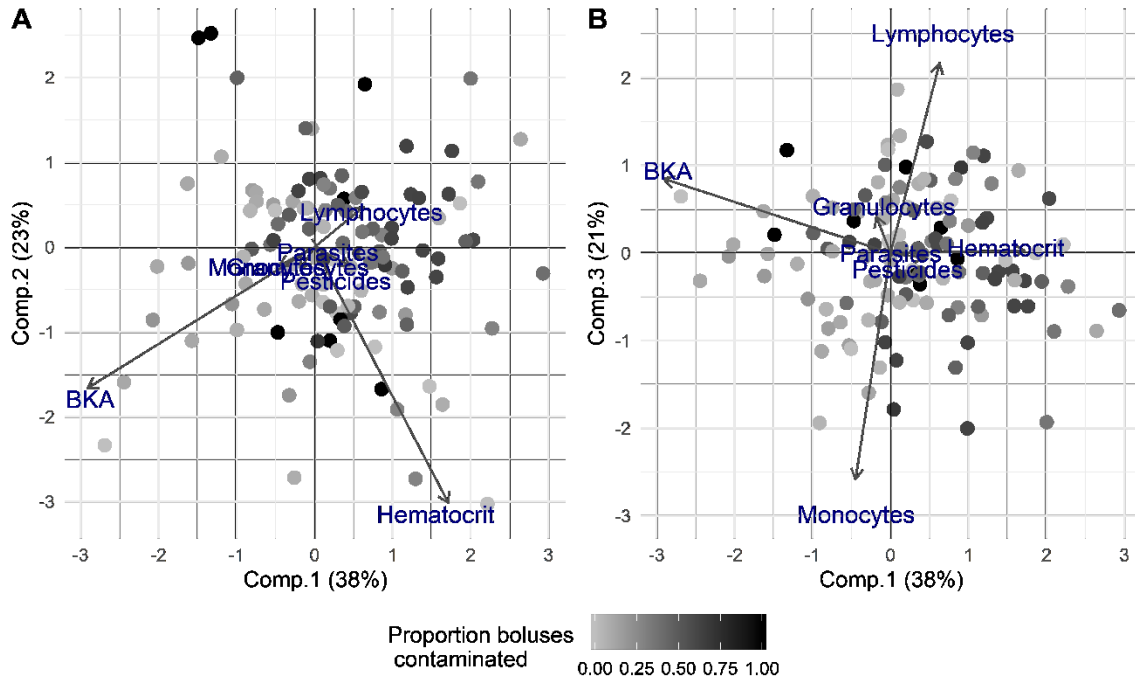


Figure 5 : Compositional PCA of physiological markers (hematocrit, BKA, number of granulocytes, number of lymphocytes and number of monocytes) and environmental data (number of contaminated boluses “Pesticides”, and number of *Protocalliphora* “Parasites”).

Panel A shows components 1 and 2, which respectively explain 38 % and 23 % of variance. Panel B shows components 1 and 3, the latest explaining 21 % of variance. Points represent each nestling. Color gradient refers to proportion of boluses contaminated by pesticides at the farm scale (number of contaminated boluses / total number of boluses collected).

2.5.2 Univariate analysis

2.5.2.1 Hematocrit

Hematocrit ranged between 38.6 % and 83.4 %. The best model selected for hematocrit included the interaction between the number of contaminated boluses and the number of *Protocalliphora* ($w = 0.40$; Table S1). While mean hematocrit (\pm SD) was 63.3 ± 5.9 % and did not vary with pesticide exposure in the absence of *Protocalliphora*, it decreased at an increasing rate with pesticide exposure as parasite load increased (Figure 6). Interestingly, nestlings exposed to large parasite loads tended to show an increased

hematocrit at low pesticide exposure (Figure 6). We also found that males showed on average a 2 % higher hematocrit level than females and that older nestlings had a lower hematocrit than younger ones, even within a reduced age window of 7 to 12 days (Table 1). The second-best model ($w = 0.32$; Table S8) was the full model, which had the same structure as the best one, plus the year effect (see Table S3 for model selection details and S9 for third-best model information).

Table 1 : Estimates of the best model predicting hematocrit in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	62.89	0.55	61.85	63.92
Number of contaminated boluses	-1.15	0.44	-2.15	-0.31
Number of <i>Protocalliphora</i>	0.99	0.31	0.38	1.59
Sex (Male)	1.59	0.46	0.69	2.49
Brood size	0.39	0.31	-0.24	0.99
Total number of boluses	1.05	0.38	0.33	1.84
% extensive cultures	-0.32	0.52	-1.30	0.67
Age	-1.07	0.27	-1.59	-0.55
Number of contaminated boluses *	-1.92	0.50	-2.97	-0.98
Number of <i>Protocalliphora</i>				

See Table S3 for the list of candidate models and their respective weights. Linear mixed model included nest box nested within farm as random effects. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). Female was the reference level for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

* Refers to interaction between variables

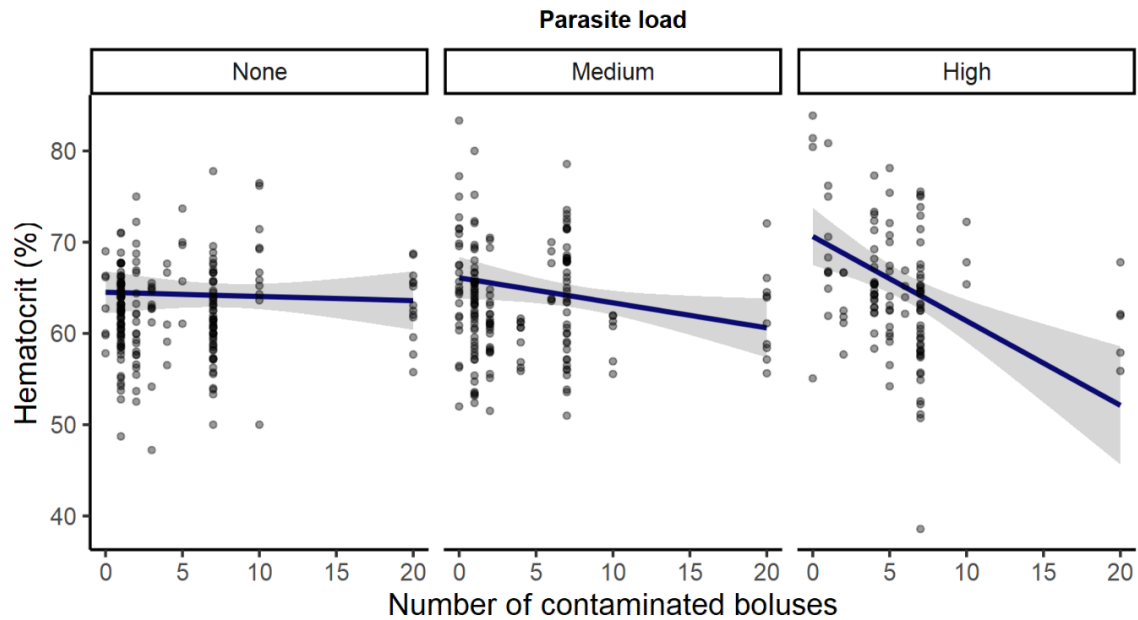


Figure 6 : Effect of pesticides and parasites on nestling hematocrit measured in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Model-averaged predictions (line) and their 95 % CIs (grey area) are based on all candidate models for the year 2015 (models are shown in Table S3). Although analyses were performed with number of *Protocalliphora* as a numeric variable, nest parasite load is here shown as three categories. The 75th percentile being 14 pupae and puparia, categories were separated into None=0, Medium= 1-14 and High=>14. Points represent raw data.

2.5.2.2 BKA

More than half (59 %) of the 507 tested nestlings showed either an absent or negative BKA (category 0) instead of a positive one (category 1). Several models received equivalent empirical support for this marker (see Table S4 for model selection details). The best selected model included number of contaminated boluses, number of *Protocalliphora*, sex and year in addition to control variables ($w = 0.27$; Table 2), but the number of contaminated boluses had no effect on BKA. This model indicated that BKA decreased with increasing parasite load (Figure 7). The second-best model included the interaction between number of contaminated boluses and number of *Protocalliphora* with year, % of extensive cultures and control variables ($w = 0.27$; Table S10), but only number of *Protocalliphora* and year influenced BKA (see also Table S11 for third-best model). Hence, although pesticide exposure and its interaction with *Protocalliphora* number were included in the second-best model, there was no evidence that they modulated the influence of parasite load on BKA.

Table 2 : Estimates of the best model predicting the bacteria-killing ability of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	1.05	0.27	0.54	1.59
Number of contaminated boluses	0.19	0.17	-0.14	0.53
Number of <i>Protocalliphora</i>	-0.27	0.11	-0.50	-0.05
Sex (Male)	0.04	0.19	-0.34	0.42
Year 2014	-1.95	0.30	-2.55	-1.37
Year 2015	-1.85	0.34	-2.53	-1.19
Brood size	0.12	0.10	-0.08	0.32
Total number of boluses	-0.42	0.15	-0.72	-0.12
% extensive cultures	0.17	0.14	-0.10	0.43

See Table S4 for the list of candidate models and their respective weights. Generalized linear model was fitted with a binomial distribution and a logit link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013 and female for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

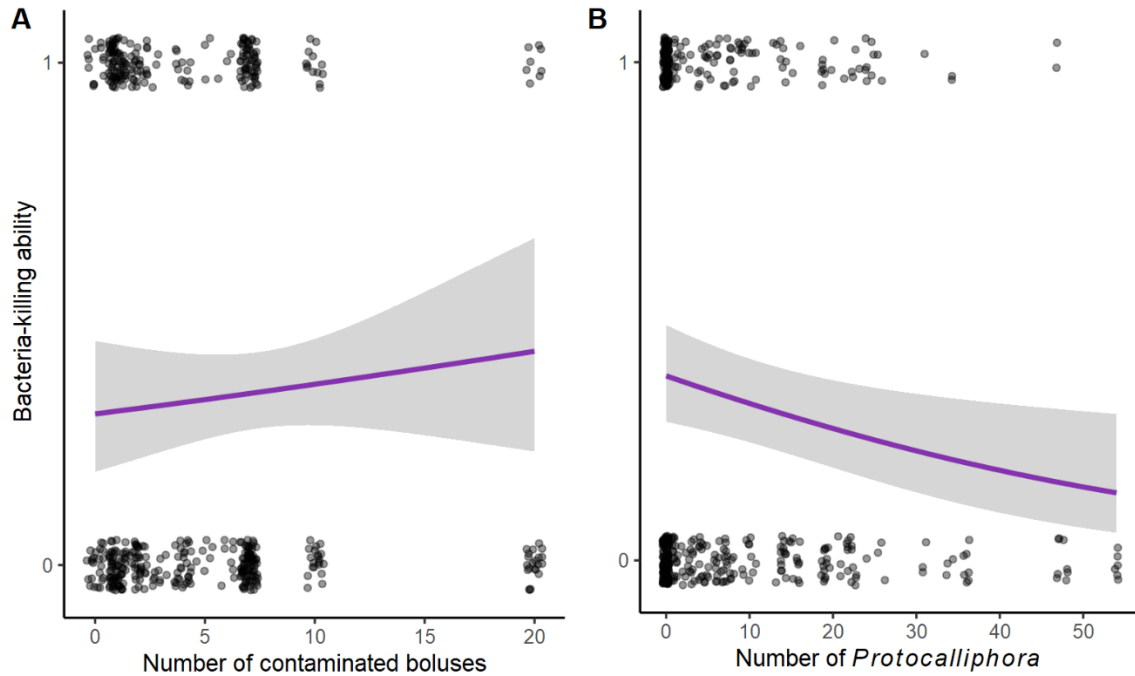


Figure 7 : Effect of A) pesticide exposure (number of contaminated boluses) and B) parasite load (number of *Protocalliphora*) on bacteria-killing ability of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Model-averaged predictions (line) and their 95 % CIs (grey area) are based on all candidate models for the year 2015 (models are shown in Table S4). Points represent raw data.

2.5.2.3 Leucocyte counts

Counts ranged from 33-88 (mean \pm SD = 64.3 ± 13.6) for granulocytes, from 6-61 (27.3 ± 13.3) for lymphocytes and from 0-47 (8.9 ± 7.1) for monocytes. Several models received equivalent empirical support for both granulocytes and monocytes (see Table S5 and S6 for model selection details). For granulocytes, the best model ($w = 0.25$; Table 3) included year, sex and percent extensive cultures within 500 m of nest box, yet only a lower count for 2014 compared to 2013 was detected (See Table S12 and S13 for second and third best models). For monocytes, the best model ($w = 0.51$; Table 4) included number of *Protocalliphora* and year, with in this case a lower count for 2015 compared to 2013. Brood size, used as a control variable for assessing the effect of parasite load in this model, had a negative effect on monocyte counts (Table 4; See Table S14 for second best model). For lymphocytes, the best model ($w = 0.63$; Table 5) included year, sex and percent of extensive

cultures within 500 m of nest box, with lower counts in 2013 compared to 2014 and 2015 as well as a positive, marginal effect of extensive cultures on this marker (See Table S7 for model selection details).

Table 3 : Estimates of the best model predicting the number of granulocytes of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	4.27	0.03	4.20	4.33
Year 2014	-0.16	0.04	-0.24	-0.09
Year 2015	-0.05	0.04	-0.12	0.03
Sex (Male)	-0.03	0.03	-0.08	0.03
% extensive cultures	-0.02	0.01	-0.05	0.00

See Table S5 for the list of candidate models and their respective weights. Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013 and female for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table 4 : Estimates of the best model predicting the number of monocytes of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	2.24	0.10	2.05	2.43
Number of <i>Protocalliphora</i>	-0.01	0.04	-0.10	0.08
Year 2014	0.19	0.12	-0.03	0.42
Year 2015	-0.66	0.13	-0.91	-0.41
Brood size	-0.15	0.05	-0.23	-0.06

See Table S6 for the list of candidate models and their respective weights. Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table 5 : Estimates of the best model predicting the number of lymphocytes of tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	3.00	0.08	2.85	3.15
Year 2014	0.36	0.08	0.19	0.52
Year 2015	0.32	0.09	0.14	0.49
Sex (Male)	0.05	0.06	-0.08	0.17
% extensive cultures	0.06	0.03	0.00	0.12

See Table S7 for the list of candidate models and their respective weights. Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013 and female for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

2.6 Discussion

Our goal was to investigate potential effects of exposure to pesticides and hematophagous *Protocalliphora* ectoparasites on the physiology of tree swallow nestlings. We considered markers linked to hematology as well as innate and acquired immunity to assess the effects of these pressures on different physiological processes of this declining species. We found a negative influence of pesticide exposure on hematocrit that increased with parasite load, suggesting a possible synergic effect of the two factors on the aerobic capacity of nestlings. BKA was however only negatively related to parasite load and none of the leucocyte counts was affected by the two factors. Although we expected the combined exposure to pesticides and parasites to influence negatively all markers, our results suggest that synergic effects may be marker-dependent. These contextual effects were also supported by the low correlations among physiological markers and between markers and environmental variables revealed by a multivariate analysis.

To our knowledge, no other study has looked at combined effects of pesticides and parasites on bird hematocrit. As expected, the negative influence of pesticides on hematocrit was stronger in highly parasitized nestlings. Ingestion and accumulation of toxic substances such as pesticides can lead to various damages to organs and altered physiological functions as well as to greater resource investments to maintain homeostasis. For instance, exposure to some pesticides is known to affect bone marrow and thereby impact erythropoiesis (e.g. thiacloprid, Singla and Sandhu, 2015), which in turn may lead to anemia (Bishop *et al.*, 1998). Parasitized nestlings also suffering from nutrient and blood losses could be compromised further in their capacity to restore red blood cells. However, we found increased hematocrit values at high parasite loads for nestlings unexposed or slightly exposed to pesticides. Some authors have argued that birds typically produce red blood cells faster in response to blood loss (Schindler *et al.*, 1987), especially when in good condition and in presence of abundant resources (Morrison *et al.*, 2009). In fact, O'brien *et al.* (2001) found that hemoglobin, but not hematocrit, was negatively affected by hematophagous parasitism, underlining active erythropoiesis as a response to blood loss. Nestlings may thus cope better with hematophagous parasitism at negligible pesticide

exposure but could not maintain such a response with combined effects of these two pressures, at least at the levels found in our system.

We unexpectedly found that older nestlings had lower hematocrit, which is inconsistent with studies that generally report a positive effect of nestling age on this marker (Potti *et al.*, 1999; Puerta *et al.*, 1989). Moreover, we found hematocrit values that averaged (\pm SE) 63.4 ± 0.6 %, which is higher than several reported values for altricial nestlings (38.9-43.2 % in *Cyanistes caeruleus*, Simon *et al.*, 2004; 42.3-43.9 % in *Sialia sialis*, Carleton 2008; median of 39.0 % in a different tree swallow population, Morrison *et al.*, 2009). Jones (2015) also reports that hematocrit usually ranges between 35 % and 55 % in birds. To investigate further this unexpected pattern, we looked at the hematocrit of 233 adults in our system for the same time period. Hematocrit for these birds averaged (\pm SE) 50.2 ± 0.3 %, which is very similar to values reported for other passerines (47.60-48.11 % in *Ficedula hypoleuca*, Potti 2007; 50.0 % in *Sialia sialis*, Hannam 2006; 53.3 % in *Parus major*, Norte *et al.* 2009). Since we measured hematocrit in the same way for both adults and nestlings and that we used a protocol similar to most of these other field studies, we are thus confident in the hematocrit values that we report. One aspect that may explain the discrepancy in hematocrit between our study and others is dehydration, which could be imputed to the fact that nest box openings face southeast in our system and may thus lead to warmer temperatures earlier in the day (Ardia *et al.*, 2006). Dehydration and subsequent reduced plasma volume is indeed a likely cause of high hematocrit in nestlings (Ardia, 2013; Campbell, 1994; Vleck and Priedkalns, 1985) and may affect blood circulation because of increased viscosity (Norte *et al.*, 2009). Although we cannot conclude that tree swallow nestlings of our study system are anemic, we believe that the negative effects of their exposure to both pesticides and hematophagous parasites merit further investigation as it may lead to an impaired aerobic capacity, and thus affect negatively the foraging of these aerial insectivores with further impacts on migration and recruitment (Evans *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2007).

We also investigated potential combined effects of food contamination by pesticides and hematophagous parasites on both innate (BKA, granulocytes and monocytes) and adaptative (lymphocytes) immune markers of tree swallow nestlings. Immunocompetence

is especially important in wildlife because they are constantly exposed to various pathogens, but we only found a negative influence of parasite load on BKA against *E. coli* that was not exacerbated by pesticide exposure. The negative impact of *Protocalliphora* on BKA was expected and concurs with the results of one of the rare studies that addressed the influence of ectoparasites on BKA. That study found that nestlings of European starlings (*Sturnus vulgaris*) affected by high loads of hematophagous mites had lower BKA, yet only in older broods (15-day-old; Eisner Pryor and Casto 2015). The authors concluded to a trade-off between growth and immunity toward the end of the nestlings' development with a greater investment into growth prior to fledging. Although we did not assess BKA at different ages, the negative effect of *Protocalliphora* we report could also reflect energy investment in growth at the expense of immunity (Norris and Evans, 2000), potentially to allow nestlings to fledge earlier and limit negative impacts of parasitism (Saino *et al.*, 1998).

Contrary to what we expected, BKA was not related by exposure to pesticides through food. Several non-mutually exclusive mechanisms may explain this lack of influence, including a confounding effect of *E. coli* exposure and an insufficient stress from either pesticides or ectoparasites. For instance, the farms where we detected greater numbers of pesticides in the food of tree swallow nestlings are located in the most intensively cultivated parts of our study area (Poisson 2019; see also Giroux 2019; Montiel-Leon *et al.* 2019). These farms are also located where a greater density of manure heaps and tanks is found (Ghilain and Bélisle, 2008). As those sites are likely to hold higher loads of *E. coli*, a bacteria typically associated with fecal matter (Asano *et al.*, 2011), nestlings born therein should experience higher exposure to *E. coli* and show a higher production of specific antibodies toward these bacteria (Matson *et al.*, 2006; Millet *et al.*, 2007). This effect could in turn counterbalance or mask the impact of greater pesticide exposure on such farms. Support for such a conjecture can be found in Schmitt *et al.* (2017) who found that adult tree swallows of our study area showed higher BKA against *E. coli* when breeding in intensive farmlands.

The possibility that the stress level experienced by tree swallow nestlings was not severe enough for us to detect an effect of pesticides on immune markers, alone or in combination

with *Protocalliphora* parasitism, should also be considered. Although it is quite difficult to estimate the (cumulative) toxic impact of the cocktail of pesticides to which nestlings in our study area were exposed (e.g. Etterson *et al.*, 2017; Mineau, 2005), it remains that pesticide detection and quantification rates were very low despite the significantly small LODs and LOQs attained when analyzing insect boluses fed to nestlings (Haroune *et al.*, 2015). With respect to parasite load, which averaged (\pm SE) 1.8 ± 0.2 *Protocalliphora* per nestling, it was similar to the one reported in a study that found no effect of industrial contaminant (i.e., sulfuric oxides and heavy metals) exposure on either growth or survival of altricial nestlings (Eeva *et al.*, 1994). The authors concluded that parasite load was not high enough to have adverse effects even in polluted sites (2.0 ± 0.3 *Protocalliphora* per *Parus major* nestling and 2.4 ± 0.4 *Protocalliphora* per *Ficedula hypoleuca* nestling; Eeva *et al.* 1994). In contrast, in a study on tree swallows in Alberta, Canada, Gentes *et al.* (2007) found that 100 % of their 38 broods were infested by the same parasite and mean pupae per nestling ranged (\pm SD) from 6.8 ± 3.5 in controlled site to 15.1 ± 7.9 in sites polluted by oil sand exploitation byproducts (i.e., polycyclic aromatic hydrocarbons and naphthenic acids). This parasite load is at least three times higher than what we measured in our study, and the authors found evidence of a negative combined effect on nestling body mass. It is then plausible that only highly parasitized nestlings are prone to detrimental combined effects with contaminants. We suggest that *Protocalliphora* loads found in our system are low enough so that nestlings can maintain a normal immune function while efficiently coping with detrimental effects of pesticides.

In contrast to BKA, we found no effect of *Protocalliphora* on leucocyte counts. Although there have been little studies on hematophagous parasite effects on these immune markers, we expected a response because the attachment of these parasites can wound their host (Bennett and Whitworth, 1991) and thus lead to a local inflammatory response that can cause an accumulation of leucocytes in peripheral blood. For example, a post-exposition increase in cutaneous granulocytes was observed in pigeons (*Columba sp.*) experimentally infected with *Argas polonicus* ticks (Dusbábek *et al.*, 1988). Similarly, house martins (*Delichon urbica*) infected with louse flies (Diptera, Hippoboscidae) showed higher levels of leucocytes, especially lymphocytes, than non-infected individuals (Saino *et al.*, 1998). This being said, leucocyte counts in free-ranging animals remain criticized, because high

counts could be either due to an effective immune system or reflect a current infection (Davis *et al.*, 2008). Many authors therefore suggest investigating granulocytes to lymphocytes ratio (G/L), a measure of physiological stress that tends to increase following an exposure to environmental pressures, due to action of glucocorticoids that increase number of circulating granulocytes while decreasing circulating lymphocytes (Davis *et al.*, 2008; Johnstone *et al.*, 2012). Although other studies found that pesticides (Shutler and Marcogliese, 2011) and parasites (Müller *et al.*, 2011) increased this ratio, we found that neither of these factors influenced G/L ratio of tree swallow nestlings (see Table S15-S17 for model selection and best models details).

The lack of effect of pesticide exposure on BKA and leucocytes could also be explained by a beneficial exposure to *Protocalliphora*. Parasites can indeed absorb part of the contaminants circulating within their hosts as observed in many studies where parasites bioaccumulated metals from their hosts and potentially biased their hosts true exposure to such contaminants (reviewed in Sures *et al.* 2017). For example, Robinson *et al.* (2010) found that *Contracaecum* nematodes parasitizing double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) had 1.5 times higher mercury concentration in their tissues than their hosts' muscles. Since some pesticides such as organophosphates, carbamates, pyrethroids (Kudo *et al.*, 2012) and neonicotinoids (Hao *et al.*, 2018) are detectable in peripheral blood, *Protocalliphora* may thus absorb part of those pesticides and thereby mitigate immunotoxic effects. This effect would be an example of antagonist effect of combined stress exposure (Sures, 2008), yet no study has to our knowledge tried to measure trophic contamination by pesticides in hematophagous ectoparasites and this hypothesis remains to be verified.

It should be noted that because *Protocalliphora* larvae feed at night (Bennett and Whitworth, 1991), we could not measure each nestling's parasite load and had to estimate it using the total number of parasites and brood size, thus assuming an equivalent aggregation of *Protocalliphora* on each nestling. However, several studies found that hematophagous parasites tend to aggregate on the less immunocompetent nestling of a brood (Christe *et al.*, 1998; Roulin *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2003), implying that we may have over- or underestimated parasite effects for some individuals. Finally, it is also

important to underline that an “invisible” fraction of nestlings could not be taken into account in this study because they died prior to blood sampling (45 nestlings out of 793 that hatched in our system between 2013 and 2015). For instance, Christe *et al.* (1998) found that house martin dead nestlings tended to have lower leucocyte and red blood cell counts than their fledged siblings at the same age, although this difference was not significant. Tree swallow nestlings that died early may thus have suffered more from pesticide and parasite exposure than nestlings for which we measured physiological markers, leading to an underestimation of the effects caused by these two factors.

2.7 Concluding remarks

While we found no effect of pesticides or hematophagous ectoparasites on tree swallow nestling’s immunity, we reported evidence of a combined effect of those two environmental pressures on hematocrit, partially supporting our prediction. This marker-dependent trend underlines the complexity of studying physiological responses in the wild. Specifically, our study highlights the importance of considering multiple factors to accurately assess anthropogenic contaminant effects on wildlife. Over the past decades, several aerial insectivore populations showed severe declines in North America (NABCI, 2019; Rosenberg *et al.*, 2019). Pesticides are likely to play an important role in this decline and their interaction with parasites should be considered in future ecotoxicological studies. Because the toxic load of pesticides is still increasing in the environment (Dibartolomeis *et al.*, 2019), we can expect larger impacts on physiology of wildlife and increased possibilities of combined effects with parasites. More studies under natural settings are definitely needed to understand both the lethal and sublethal effects of pesticides on wildlife, especially in declining species (Mineau, 2005).

2.8 References

- Ardia, D.R. (2013). The effects of nestbox thermal environment on fledging success and haematocrit in Tree Swallows. *Avian Biol. Res.* 6, 99–103.
- Ardia, D.R., Pérez, J.H., and Clotfelter, E.D. (2006). Nest box orientation affects internal temperature and nest site selection by Tree Swallows. *J. F. Ornithol.* 77, 339–344.
- Asano, R., Kubori, K., Ozutsumi, Y., Yamamoto, N., Otrawa, K., and Nakai, Y. (2011). Detection of *Escherichia coli* in a cattle manure composting process by selective cultivation and colony polymerase chain reaction. *J. Environ. Sci. Heal.* 46, 122–127.
- Belden, J.B., and Lydy, M.J. (2000). Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2266–2274.
- Bellavance, V., Bélisle, M., Savage, J., Pelletier, F., and Garant, D. (2018). Influence of agricultural intensification on prey availability and nestling diet in Tree Swallows (*Tachycineta bicolor*). *Can. J. Zool.* 96, 1053–1065.
- Bennett, G.F., and Whitworth, T.L. (1991). Studies on the life history of some species of *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Can. J. Zool.* 69, 2048–2058.
- Benton, T.G., Bryant, D.M., Cole, L., and Crick, H.Q.P. (2002). Linking agricultural practice to insect and bird populations : A historical study over three decades Linking agricultural practice to insect and bird populations : a historical study over three decades. *J. Appl. Ecol.* 39, 673–687.
- Benton, T.G., Vickery, J.A., and Wilson, J.D. (2003). Farmland biodiversity: Is habitat heterogeneity the key? *Trends Ecol. Evol.* 18, 182–188.
- Bishop, C.A., Boermans, H.J., Ng, P., Campbell, G.D., and Struger, J. (1998). Health of tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting in pesticide-sprayed apple orchards in Ontario, Canada. I. Immunological parameters. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 55, 531–559.
- Bishop, C.A., Ng, P., Mineau, P., Quinn, J., and Struger, J. (2000). Effects of pesticide spraying on chick growth, behavior, and parental care in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting in an apple orchard in Ontario, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2286–2297.
- Blakley, B., Brousseau, P., Fournier, M., and Voccia, I. (1999). Immunotoxicity of pesticides: A review. *Toxicol. Ind. Health* 15, 119–132.
- Blanar, C.A., Curtis, M.A., and Chan, H.M. (2005). Growth, nutritional composition, and hematology of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) exposed to toxaphene and tapeworm (*Diphyllbothrium dendriticum*) larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 397–404.
- Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T.J., Buck, J.C., Gervasi, S.S., and Kats, L.B. (2011). The complexity of amphibian population declines : understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *1223*, 108–119.

- Blus, L.J., and Henny, C.J. (1997). Field Studies on Pesticides and Birds : Unexpected and Unique Relations. *Ecol. Appl.* 7, 1125–1132.
- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H.H., and White, J.S.S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 24, 127–135.
- Booton, R.D., Yamaguchi, R., Marshall, J.A.R., Childs, D.Z., and Iwasa, Y. (2018). Interactions between immunotoxicants and parasite stress : Implications for host health. *J. Theor. Biol.* 445, 120–127.
- Boughton, R.K., Joop, G., Armitage, S.A.O., Boughton, R.K., Joop, G., and Armitage, S.A.O. (2011). Outdoor immunology : methodological considerations for ecologists. *Br. Ecol. Soc.* 25, 81–100.
- Brett, M.T. (2004). When is a correlation between non-independent variables “spurious”? *Oikos* 105, 647–656.
- Bright, J., Morris, T., and Winspear, R. (2008). A review of Indirect Effects of Pesticides on Birds and mitigating land-management practices. *RSPB Res. Rep.* 1–66.
- Brühl, C.A., and Zaller, J.G. (2019). Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. *Front. Environ. Sci.* 7, 1–4.
- Burgess, N.M., Hunt, K.A., Bishop, C.A., and Weseloh, D.V. (Chip) (1999). Cholinesterase inhibition in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) and eastern bluebirds (*Sialia sialis*) exposed to organophosphorus insecticides in apple orchards in Ontario, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 708–716.
- Campbell, T.W. (1994). Avian hematology and cytology. *Avian Med. Princ. Appl. Chapter* 9, 176–199.
- Campbell, L.H., Avery, M.I., Donald, P., Evans, A.D., Green, R.E., and Wilson, J.D. (1997). A review of the indirect effects of pesticides on birds. *Jt. Nat. Conserv. Committee Rep.* 227, 1–147.
- Carleton, R.E. (2008). Ectoparasites affect hemoglobin and percentages of immature erythrocytes but not hematocrit in nestling Eastern Bluebirds. *Wilson J. Ornithol.* 120, 565–568.
- Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9, 1–12.
- Christe, P., Møller, A.P., and de Lope, F. (1998). Immunocompetence and Nestling Survival in the House Martin : The Tasty Chick Hypothesis. *Oikos* 83, 175–179.
- Coico, R., and Sunshine, G. (2015). Immunology: a short course (West Sussex, England : Wiley Blackwell).
- Coors, A., Decaestecker, E., Jansen, M., and De Meester, L. (2008). Pesticides Exposure Strongly Enhances Parasite Virulence in an Invertebrate Host Model. *Oikos* 117, 1840–1846.

- Cox, C., and Sorgan, M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114, 1803–1806.
- Daoust, S.P., Savage, J., Whitworth, T.L., Bélisle, M., and Brodeur, J. (2012). Diversity and Abundance of Ectoparasitic Blow Flies Protocalliphora (Diptera: Calliphoridae) and Their Nasonia (Hymenoptera: Pteromalidae) Parasitoids in Tree Swallow Nests Within Agricultural Lands of Southern Québec, Canada. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 105, 471–478.
- Davis, A.A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., Davis, A.K., Maney, D.L., and Maerz, J.C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760–772.
- Dibartolomeis, M., Kegley, S., Mineau, P., Radford, R., and Klein, K. (2019). An assessment of acute insecticide toxicity loading (AITL) of chemical pesticides used on agricultural land in the United States. *PLoS One* 14, 1–27.
- Donald, P.F., Green, R.E., and Heath, M.F. (2001). Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proc. R. Soc. B* 268, 25–29.
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., and Bommel, F.V. (2006). Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990 – 2000. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 189–196.
- Dusbábek, F., Škárková-Špaková, V., Vítovec, J., and Šterba, J. (1988). Cutaneous and blood leucocyte response of pigeons to larval *Argas polonicus* feeding. *Folia Parasitol. (Praha)*. 35, 259–268.
- Eeva, T., Lehtikoinen, E., and Nurmi, J. (1994). Effects of ectoparasites on breeding success of great tits (*Parus major*) and pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in an air pollution gradient. *Can. J. Zool.* 72, 624–635.
- Eisner Pryor, L.J., and Casto, J.M. (2015). Blood-Feeding ectoparasites as developmental stressors: Does corticosterone mediate effects of mite infestation on nestling growth, immunity, and energy availability? *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 323, 466–477.
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., and Morrissey, C.A. (2017). Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., and Morrissey, C.A. (2019). A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science (80-.)*. 365, 1177–1180.
- Etterson, M., Garber, K., and Odenkirchen, E. (2017). Mechanistic modeling of insecticide risks to breeding birds in North American agroecosystems. *PLoS One* 12, 1–23.
- Evans, D.R., Hobson, K.A., Kusack, J.W., Cadman, M.D., Falconer, C.M., and Mitchell, G.W. (2019). Individual condition, but not fledging phenology, carries over to affect post-fledging survival in a Neotropical migratory songbird. *Ibis (Lond. 1859)*. 162, 331–344.
- Filzmoser, P., Hron, K., and Reimann, C. (2009). Principal component analysis for compositional data with outliers. *Environmetrics* 20, 621–632.

- Galloway, T., and Handy, R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 12, 345–363.
- Gentes, M.L., Whitworth, T.L., Waldner, C., Fenton, H., and Smits, J.E. (2007). Tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting on wetlands impacted by oil sands mining are highly parasitized by the bird blow fly *Protocalliphora* spp. *J. Wildl. Dis.* 43, 167–178.
- Ghilain, A., and Bélisle, M. (2008). Breeding Success of Tree Swallows Along A Gradient Of Agricultural Intensification. *Ecol. Appl.* 18, 1140–1154.
- Gibbons, D., Morrissey, C., and Mineau, P. (2014). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 103–118.
- Giroux, I. (2019). Présence de pesticides dans l’eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2015 à 2017 (Ministère de l’Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction générale du suivi de l’environnement, Québec).
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P.B., Van Turnhout, C.A.M., De Kroon, H., and Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511, 341–344.
- Hallmann, C.A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Sumser, H., Ho, T., Schwan, H., Stenmans, W., Mu, A., et al. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS One* 12, 1–21.
- Hannam, K. (2006). Ectoparasitic blow flies (*Protocalliphora* sp.) and nestling Eastern Bluebirds (*Sialia sialis*): direct effects and compensatory strategies. *Can. J. Zool.* 84, 921–930.
- Hao, C., Eng, M.L., Sun, F., and Morrissey, C.A. (2018). Part-per-trillion LC-MS / MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Sci. Total Environ.* 644, 1080–1087.
- Haroune, L., Cassoulet, R., Lafontaine, M.P., Bélisle, M., Garant, D., Pelletier, F., Cabana, H., and Bellenger, J.P. (2015). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination for multiclass pesticides from insect samples by microwave-assisted solvent extraction followed by a salt-out effect and micro-dispersion purification. *Anal. Chim. Acta* 891, 160–170.
- Hart, J.D., Milsom, T.P., Fisher, G., Wilkins, V., Moreby, S.J., Murray, A.W.A., and Robertson, P.A. (2006). The relationship between yellowhammer breeding performance, arthropod abundance and insecticide applications on arable farmland. *J. Appl. Ecol.* 43, 81–91.
- Hartig, F. (2019). DHARMA Package. Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/DHARMA/index.html>.
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., and Stice, M. (2010). The cause of global amphibian declines : a developmental endocrinologist ’ s perspective. *J. Exp. Biol.* 213, 921–933.

- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., et al. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* *408*, 3746–3762.
- Howe, F.P. (1992). Effects of *Protocalliphora braueri* (Diptera: Calliphoridae) parasitism and inclement weather on nestling sage thrashers. *J. Wildl. Dis.* *28*, 141–143.
- Hron, K., Templ, M., and Filzmoser, P. (2010). Exploratory compositional data analysis using the R-package robCompositions. In *Ninth International Conference Data Analysis and Modeling*, pp. 179–186.
- Hua, J., and Relyea, R. (2014). Chemical cocktails in aquatic systems: Pesticide effects on the response and recovery of >20 animal taxa. *Environ. Pollut.* *189*, 18–26.
- Johnstone, C.P., Reina, R.D., and Lill, A. (2012). Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* *182*, 861–879.
- Jones, M.P. (2015). Avian Hematology. *Clin. Lab. Med.* *35*, 649–659.
- King, K.C., Daniel Mclaughlin, J., Boily, M., and Marcogliese, D.J. (2010). Effects of agricultural landscape and pesticides on parasitism in native bullfrogs. *Biol. Conserv.* *143*, 302–310.
- Köhler, H.-R., and Triebkorn, R. (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides : Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science (80-.)*. *341*, 759–766.
- Kudo, K., Nagamatsu, K., Umehara, T., Usumoto, Y., Sameshima, N., Tsuji, A., and Ikeda, N. (2012). Rapid and reliable screening method for detection of 70 pesticides in whole blood by gas chromatography – mass spectrometry using a constructed calibration-locking database. *Leg. Med.* *14*, 93–100.
- Kwon, Y.-K., Wee, S.-H., and Kim, J.-H. (2004). Pesticide poisoning events in wild birds in Korea from 1998 to 2002. *J. Wildl. Dis.* *40*, 737–740.
- Lebrun, J.D., De Jesus, K., Rouillac, L., Ravelli, M., Guenne, A., and Tournebize, J. (2020). Single and combined effects of insecticides on multi-level biomarkers in the non-target amphipod *Gammarus fossarum* exposed to environmentally realistic levels. *Aquat. Toxicol.* *218*, 1–11.
- Legendre, P., and Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology* (New-York: Elsevier).
- Lochmiller, R.L., and Deerenberg, C. (2000). Just What Is the Cost of Immunity ? *Oikos* *88*, 87–98.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., and Mateo, R. (2015a). Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environ. Res.* *136*, 97–107.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Blas, E.G. De, Camarero, P.R., Mougeot, F., and Mateo, R. (2015b). Adverse effects of thiram-treated seed ingestion on the

reproductive performance and the offspring immune function of the red-legged partridge. *Environ. Toxicol. Chem.* *34*, 1320–1329.

Marcogliese, D.J., and Pietrock, M. (2011). Combined effects of parasites and contaminants on animal health: Parasites do matter. *Trends Parasitol.* *27*, 123–130.

Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., and Boily, M. (2009). Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquat. Toxicol.* *91*, 126–134.

Marcogliese, D.J., Dautremepuits, C., Gendron, A.D., and Fournier, M. (2010). Interactions between parasites and pollutants in yellow perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River, Canada: implications for resistance and tolerance to parasites. *Can. J. Zool.* *88*, 247–258.

Marteinson, S.C., Marcogliese, D.J., and Verreault, J. (2017). Multiple stressors including contaminant exposure and parasite infection predict spleen mass and energy expenditure in breeding ring-billed gulls. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* *200*, 42–51.

Matson, K.D., Tieleman, B.I., and Klasing, K.C. (2006). Capture Stress and the Bactericidal Competence of Blood and Plasma in Five Species of Tropical Birds. *Physiol. Biochem. Zool.* *79*, 556–564.

Mayne, G.J., Martin, P.A., Bishop, C.A., and Boermans, H.J. (2004). Stress and immune responses of nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*) and eastern bluebirds (*Sialia sialis*) exposed to nonpersistent pesticides and p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* *23*, 2930–2940.

Mayne, G.J., Bishop, C.A., Martin, P.A., Boermans, H.J., and Hunter, B. (2005). Thyroid function in nestling tree swallows and eastern bluebirds exposed to non-persistent pesticides and p, p'-DDE in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Ecotoxicology* *14*, 381–396.

Michel, N.L., Smith, A.C., Clark, R.G., Morrissey, C.A., and Hobson, K.A. (2016). Differences in spatial synchrony and interspecific concordance inform guild-level population trends for aerial insectivorous birds. *Ecography (Cop.)*. *39*, 774–786.

Millet, S., Bennett, J., Lee, K.A., Hau, M., and Klasing, K.C. (2007). Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Dev. Comp. Immunol.* *31*, 188–201.

Mineau, P. (2005). A Review and Analysis of Study Endpoints Relevant to the Assessment of “Long Term” Pesticide Toxicity in Avian and Mammalian Wildlife. *Ecotoxicology* *14*, 775–799.

Mineau, P., and Palmer, C. (2013). The Impact of the Nation's Most Widely Used Insecticides on Birds. *Am. Bird Conserv.* 1–96.

Mineau, P., and Tucker, K.R. (2002). Improving Detection of Pesticide Poisoning in Birds. *J. Wildl. Rehabil.* *25*, 4–13.

- Mineau, P., and Whiteside, M. (2013). Pesticide Acute Toxicity Is a Better Correlate of U.S. Grassland Bird Declines than Agricultural Intensification. *PLoS One* 8, 1–8.
- Møller, A.P. (2019). Parallel declines in abundance of insects and insectivorous birds in Denmark over 22 years. *Ecol. Evol.* 9, 6581–6587.
- Montiel-León, J.M., Munoz, G., Vo Duy, S., Do, D.T., Vaudreuil, M.A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., and Sauvé, S. (2019). Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ. Pollut.* 250, 29–39.
- Morrison, E.S., Ardia, D.R., and Clotfelter, E.D. (2009). Cross-fostering reveals sources of variation in innate immunity and hematocrit in nestling tree swallows *Tachycineta bicolor*. *J. Avian Biol.* 40, 573–578.
- Müller, C., Jenni-Eiermann, S., and Jenni, L. (2011). Heterophils / Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Funct. Ecol.* 25, 566–576.
- Murphy, M.T. (2003). Avian Population Trends within the Evolving Agricultural Landscape of Eastern and Central United States. *Auk* 120, 20–34.
- Norris, K., and Evans, M.R. (2000). Ecological immunology : life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11, 19–26.
- Norte, A.C., Ramos, J.A., Sousa, J.P., and Sheldon, B.C. (2009). Variation of adult Great Tit *Parus major* body condition and blood parameters in relation to sex, age, year and season. *J. Ornithol.* 150, 651–660.
- North American Bird Conservation Initiative Canada (NABCI) (2019). The state of Canada's birds. Environment and Climate Change Canada, Ottawa, Canada.
- O'brien, E., Morrisson, B., and Johnson, S. (2001). Assessing the effects of haematophagous ectoparasites on the health of nest-ling birds: haematocrit vs. hemoglobin levels in house wrens parasitized by blow fly larvae. *J. Avian Biol.* 32, 73–76.
- Pigeon, G., Baeta, R., Belisle, M., Garant, D., and Pelletier, F. (2013a). Effects of agricultural intensification and temperature on immune response to phytohemagglutinin in Tree Swallows (*Tachycineta bicolor*). *Can. J. Zool.* 91, 56–63.
- Pigeon, G., Bélisle, M., Garant, D., Cohen, A.A., and Pelletier, F. (2013b). Ecological immunology in a fluctuating environment: An integrative analysis of tree swallow nestling immune defense. *Ecol. Evol.* 3, 1091–1103.
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M., et al. (2014). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68–102.
- Poisson, M.-C. (2019). Effets des pesticides agricoles sur la performance de reproduction d'un insectivore aérien en déclin. Master thesis.

- Porlier, M., Belisle, M., and Garant, D. (2009). Non-random distribution of individual genetic diversity along an environmental gradient. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1543–1554.
- Potti, J. (2007). Variation in the hematocrit of a passerine bird across life stages is mainly of environmental origin. *J. Avian Biol.* 38, 726–730.
- Potti, J., Moreno, J., Merino, S., Frías, O., and Rodríguez, R. (1999). Environmental and Genetic Variation in the Haematocrit of Fledgling Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia* 120, 1–8.
- Puerta, M.L., Muñoz Pulido, R., Huecas, V., and Abelenda, M. (1989). Hematology and blood chemistry of chicks of white and black storks (*Ciconia ciconia* and *Ciconia nigra*). *Comp. Biochem. Physiol. - Part A Physiol.* 94, 201–204.
- Quinney, T.E., Hussell, D.J.T., Ankney, C.D., and Rowan, P. (1986). Sources of variation in growth of tree swallows. *Auk* 103, 389–400.
- Rioux Paquette, S., Garant, D., Pelletier, F., and Bélisle, M. (2013). Seasonal patterns in Tree Swallow prey (Diptera) abundance are affected by agricultural intensification. *Ecol. Appl.* 23, 122–133.
- Robinson, S.A., Forbes, M.R., and Hebert, C.E. (2010). Mercury in parasitic nematodes and trematodes and their double-crested cormorant hosts : Bioaccumulation in the face of sequestration by nematodes. *Sci. Total Environ.* 408, 5439–5444.
- Rogers, K.H., Mcmillin, S., Olstad, K.J., and Poppenga, R.H. (2019). Imidacloprid Poisoning of Songbirds Following a Drench Application of Trees in a Residential Neighborhood in. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1724–1727.
- Rohr, J.R., and McCoy, K.A. (2010). A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environ. Health Perspect.* 118, 20–32.
- Rosenberg, K. V, Dokter, A.M., Blancher, P.J., Sauer, J.R., Smith, A.C., Smith, P.A., Stanton, J.C., Panjabi, A., Helft, L., Parr, M., et al. (2019). Decline of the North American avifauna. *Science* (80-.). 1313, 1–10.
- Roulin, A., Brinkhof, M.W.G., Bize, P., Richner, H., Jungi, T.W., Bavoux, C., Boileau, N., and Burneleau, G. (2003). Which chick is tasty to parasites ? The importance of host immunology vs . parasite life history. *J. Anim. Ecol.* 75, 75–81.
- Sabrosky, C.W., Bennett, G.F., and Whitworth, T.L. (1989). Bird Blow Flies (Protocalliphora) in North America (Diptera: Calliphoridae), with notes on the Pelearctic species (Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press).
- Saino, N., Calza, S., and Møller, A.P. (1998). Effects of a Dipteran Ectoparasite on Immune Response and Growth Trade-Offs in Barn Swallow, *Hirundo rustica*. *Oikos* 81, 217–228.
- Schindler, S.L., Gildersleeve, R.P., Thaxton, J.P., and McRee, D.I. (1987). Hematological response of hemorrhaged Japanese quail after blood volume replacement with saline. *Comp. Biochem. Physiol.* 87, 933–945.

- Schmitt, C., Garant, D., Bélisle, M., and Pelletier, F. (2017). Agricultural Intensification Is Linked to Constitutive Innate Immune Function in a Wild Bird Population. *Physiol. Biochem. Zool.* *90*, 201–209.
- Sheldon, B.C., and Verhulst, S. (1996). Ecological immunology - costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* *11*, 317–321.
- Shutler, D., and Marcogliese, D.J. (2011). Leukocyte Profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, Exposed to Pesticides and Hematozoa in Agricultural Wetlands. *Copeia* *2011*, 301–307.
- Simon, A., Thomas, D.W., Blondel, J., Lambrechts, M.M., and Perret, P. (2003). Within-Brood Distribution of Ectoparasite Attacks on Nestling Blue Tits: A Test of the Tasty Chick Hypothesis Using Inulin as a Tracer. *Oikos* *102*, 551–558.
- Simon, A., Thomas, D., Blondel, J., Perret, P., and Lambrechts, M.M. (2004). Physiological Ecology of Mediterranean Blue Tits (*Parus caeruleus* L.): Effects of Ectoparasites (*Protocalliphora* spp.) and Food Abundance on Metabolic Capacity of Nestlings. *Physiol. Biochem. Zool.* *77*, 492–501.
- Simon, A., Thomas, D.W., Bourgault, P., Blondel, J., Perret, P., and Lambrechts, M.M. (2005). Between-population differences in nestling size and hematocrit level in blue tits (*Parus caeruleus*): a cross-fostering test for genetic and environmental effects. *Can. J. Zool.* *83*, 694–701.
- Singla, S., and Sandhu, H.S. (2015). Alterations in Hematological Profile of Experimentally Induced Subchronic Thiachloprid Toxicosis in *Gallus domesticus*. *Toxicol. Int.* *22*, 147–152.
- Smith, A.C., Hudson, M.A.R., Downes, C.M., and Francis, C.M. (2015). Change points in the population trends of aerial-insectivorous birds in North America: Synchronized in time across species and regions. *PLoS One* *10*, 1–24.
- Solomon, K., Baker, D., Richards, P., Dixon, K., Klaine, S., La Point, T., Kendall, R., Giddings, J., Giesy, J., Hall, L., et al. (1996). Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* *15*, 31–76.
- Spiller, K.J., and Dettmers, R. (2019). Evidence for multiple drivers of aerial insectivore declines in North America. *Condor* *121*, 1–13.
- Stambaugh, T., Houdek, B.J., Lombardo, M.P., Thorpe, P.A., and Caldwell Hahn, D. (2011). Innate Immune Response Development in Nestling Tree Swallows. *Wilson J. Ornithol.* *123*, 779–787.
- Stanton, R.L., Morrissey, C.A., and Clark, R.G. (2018). Agriculture, Ecosystems and Environment Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* *254*, 244–254.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Ana, S.L., Fischman, D.L., and Waller, R.W. (2004). Status and Trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* (80-.). *306*, 1783–1786.

- Sures, B. (2008). Host-parasite interactions in polluted environments. *J. Fish Biol.* 73, 2133–2142.
- Sures, B., Nachev, M., Selbach, C., and Marcogliese, D.J. (2017). Parasite responses to pollution : what we know and where we go in ‘Environmental Parasitology.’ *Parasites and Vectors* 10, 1–20.
- Thomas, D., Shipley, B., Blondel, J., Perret, P., Simon, A., and Lambrechts, M. (2007). Common Paths Link Food Abundance and Ectoparasite Loads to Physiological Performance and Recruitment in Nestling Blue Tits. *Funct. Ecol.* 21, 947–955.
- Tieleman, B.I., Croese, E., Helm, B., and Versteegh, M.A. (2010). Repeatability and individual correlates of microbicidal capacity of bird blood. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 156, 537–540.
- Vleck, C.M., and Friedkalns, J. (1985). Reproduction in Zebra Finches : Hormone Levels and Effect of Dehydration. *Condor* 87, 37–46.
- Wagner, D.L. (2019). Insect Declines in the Anthropocene. *Annu. Rev. Entomol.* 65, 457–480.
- Whitworth, T.L., and Bennett, G.F. (1992). Pathogenicity of larval Protocalliphora (Diptera : Calliphoridae) parasitizing nestling birds. *Can. J. Zool.* 70, 2184–2191.
- Winkler, D.W., Hallinger, K.K., Ardia, D.R., Robertson, R.J., Stutchbury, B.J., and Cohen, R.R. (2011). Tree Swallow (*Tachycineta bicolor*). In *The Birds of North America Online*, (Cornell lab of ornithology, Ithaca, New York)
- Zaller, J.G., and Brühl, C.A. (2019). Editorial: Non-target Effects of Pesticides on Organisms Inhabiting Agroecosystems. *Front. Environ. Sci.* 7, 1–3.

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1 Retour sur les objectifs et les résultats

L'objectif de mon projet était de quantifier les effets combinés de l'exposition à des pesticides agricoles et à des ectoparasites hématophages sur des marqueurs physiologiques chez les oisillons de l'Hirondelle bicolor. Mon hypothèse était que l'hématocrite, le BKA et le compte de leucocytes seraient affectés par une exposition combinée aux pesticides et aux *Protocalliphora* où les effets de l'exposition à un de ceux facteurs seraient exacerbés par l'intensité de l'autre. Ainsi, les oisillons exposés à la fois à une forte intensité de pesticides et de parasites seraient les plus négativement affectés. Cette hypothèse n'a été que partiellement supportée par mes observations puisque seul l'hématocrite fut affecté négativement par l'interaction entre les pesticides et les parasites. Bien que nous nous attendions à ce que le BKA et les leucocytes soient affectés de manière similaire, les résultats suggèrent plutôt que la réponse est marqueur-dépendant, démontrant toute la complexité de l'étude des systèmes physiologiques en milieu naturel. Le grand nombre d'individus considérés (>500 pour l'hématocrite et la capacité bactéricide) et l'utilisation de multiples marqueurs physiologiques m'ont permis de réaliser une contribution originale et solide sur les effets combinés des pesticides et des parasites en milieu naturel.

L'hématocrite est un marqueur largement utilisé chez les oiseaux (Geens *et al.*, 2010; Lill *et al.*, 2013; Markowski *et al.*, 2015; Sakaluk *et al.*, 2015) qui témoigne de la performance physiologique de l'individu, et plus concrètement, de sa capacité aérobie. Ceci est particulièrement crucial pour les individus en croissance, mais également pour les adultes chez qui le vol représente une activité très exigeante en oxygène (Butler, 2016; Nespolo *et al.*, 2018). Nous avons montré que l'hématocrite est négativement affecté par l'exposition combinée aux pesticides et aux parasites, ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été observé chez les oiseaux. Les oisillons ainsi affectés pourraient avoir une moins bonne

capacité à transporter l'oxygène dans l'organisme dès l'envol, ce qui pourrait également affecter leur migration hivernale et leur recrutement au sein de la population (Krause *et al.*, 2016; Puerta *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 2007). Bien que nous nous soyons concentrés sur les oisillons pour la présente étude, ces résultats laissent présager la possibilité que les adultes puissent être affectés de manière similaire. Les adultes peuvent en effet être exposés, et ce de manière plus prolongée, aux mêmes pesticides et peuvent être infestés par d'autres parasites comme les mites hématophages (Møller, 1990).

À l'inverse et contrairement à nos prédictions, nous n'avons pas trouvé d'effets combinés sur les marqueurs immunitaires mesurés, c'est-à-dire le BKA et les leucocytes. À l'image d'une étude s'étant intéressée aux effets de *Protocalliphora* sur la croissance et la survie d'oisillons le long d'un gradient de pollution atmosphérique (Eeva *et al.*, 1994), la charge parasitaire sur notre système semble insuffisante pour avoir des effets délétères sur l'immunité des oisillons, même sur les fermes où il y a beaucoup de pesticides. Au-delà de l'exposition à ces substances, la nidification dans des milieux cultivés intensivement présente de nombreux coûts en termes de fitness pour les Hirondelles, puisque ce sont des milieux de moins bonne qualité que ceux extensifs. Les insectes sont, par exemple, moins abondants en milieu de saison dans ce milieu (Rioux Paquette *et al.*, 2013), la compétition avec les moineaux domestiques (*Passer domesticus*) est plus forte (Robillard *et al.*, 2013) et on observe notamment une réduction de la taille de couvée (Ghilain et Bélisle 2008; Pellerin *et al.* 2016). Les individus nichant en milieux cultivés intensivement sont ainsi confrontés à des compromis en termes d'allocation énergétique et ceci pourrait influencer leur capacité immunitaire. Par exemple, dans notre système d'étude, Pigeon et al. (2013) ont montré que l'expression et le patron de corrélation entre sept mesures immunitaires (réponse à la phytohématagglutinine, capacité d'hémolyse, capacité d'hémagglutination, BKA, % de lymphocytes, % d'hétérophiles et % d'éosinophiles) sont influencés par l'intensité des pratiques agricoles, mais que l'effet dépend de l'année. À l'inverse, Schmitt et al. (2017) ont trouvé que l'intensification agricole avait un effet positif sur le BKA mesuré chez les Hirondelles bicolores nicheuses. Il est donc probable que nous ne capturons pas toute la complexité de la réponse immunitaire et que celle-ci soit modulée par un grand nombre de facteurs environnementaux que nous n'avons pas considérés.

3.2 Limites de l'étude

Notre étude présente certaines limites méthodologiques. Tout d'abord, la mesure d'exposition aux pesticides utilisée n'est pas idéale. Le nombre de boulettes d'insectes contaminées récoltées à l'échelle de la ferme est fort probablement une mesure trop grossière pour estimer correctement l'exposition des oiseaux aux pesticides agricoles et leurs effets toxiques sur les marqueurs étudiés. Cette approche a néanmoins été utilisée puisque nous avons une part importante de données censurées. Concrètement, pour 98 % des boulettes récoltées, la concentration en pesticides était trop faible pour que nous puissions les détecter, c'est-à-dire était inférieure à la LOD imposée par la méthode de mesure en laboratoire (Haroune *et al.*, 2015). Ceci ne nous permettait pas de travailler directement avec la concentration en pesticides. Une approche pour modéliser un indice d'impact des insecticides sur les oiseaux été proposée par Etterson et ses collaborateurs (2017), où ils ont simulé des applications de pesticides basées sur les modes d'utilisation des substances et en prenant en compte la toxicité relative des substances et leurs effets sur des espèces aviaires. Bien qu'intéressante, cette méthode a tout de même des limitations, notamment dues aux nombreuses suppositions du modèle et au manque de connaissances sur les effets de la coexposition à plusieurs pesticides (Maloney *et al.*, 2017, 2018a, 2018b). Il serait donc intéressant de compléter le portrait de l'exposition des Hirondelles grâce à un échantillonnage plus large, par exemple en installant des capteurs d'air sur les fermes (Jaward *et al.*, 2004; Kalina *et al.*, 2018) ou en analysant les résidus dans des échantillons de sol (Ukalska-Jaruga *et al.*, 2020). Par ailleurs, les données de vente de pesticides rendues disponibles par le MELCC sont très succinctes et permettent difficilement aux scientifiques de les exploiter à fine échelle pour inférer l'exposition de la faune. Par exemple, les quantités d'ingrédients actifs vendues sont exprimées par des cotes imprécises (ex : >1 000 à 10 000 kg), et ce, à l'échelle de la province québécoise (MELCC, 2020). Un suivi plus serré et précis des ventes de ces substances, par exemple par parcelles de 100 km², de même qu'un accès libre à ces informations permettrait plus de transparence et une utilisation de ces données à des fins de recherche.

Puisque nous avons échantillonné les oisillons à partir de l'âge d'environ 8 jours, il faut souligner qu'une part non négligeable de la population n'est pas considérée dans nos analyses, c'est-à-dire les oisillons morts en bas âge (ce qui représente 45 oisillons morts sur un total de 793 nés sur les fermes échantillonnées entre 2013 et 2015). Dans une étude portant sur l'Hirondelle de fenêtre, les chercheurs ont déterminé que les individus morts en bas âge avaient un hémocrite et un nombre total de leucocytes plus faible que les autres oisillons de la nichée s'étant envolés (Christe *et al.*, 1998). Ceci laisse supposer que les oisillons pour lesquels nous avons pris des mesures physiologiques sont les plus performants de leur nichée, et potentiellement ceux ayant le moins souffert d'éventuels effets des pesticides et des parasites. Il serait par ailleurs intéressant d'effectuer des nécropsies des oisillons morts avant l'envol pour déterminer la cause de la mort. Il serait par exemple possible vérifier si celle-ci est attribuable à un empoisonnement aux pesticides en mesurant les résidus présents dans le système digestif et autres tissus, bien que cela ne soit pas toujours possible puisque certains résidus se dégradent très rapidement (Kwon *et al.*, 2004; Prosser *et al.*, 2006).

3.3 Perspectives

Bien que l'analyse des boulettes d'insectes comme vecteurs d'exposition aux pesticides soit novatrice et intéressante, il serait pertinent d'élargir notre compréhension du devenir des pesticides largués dans l'environnement. De plus en plus d'études montrent l'omniprésence des pesticides dans les cours d'eau et les sols en milieu agricoles (Dibartolomeis *et al.*, 2019; Main *et al.*, 2014; Montiel-León *et al.*, 2019). Par exemple, un récent rapport fait état de l'omniprésence de pesticides dans les cours d'eau agricoles du Québec, comme l'atrazine, le glyphosate, le métolachlore, la chlothianidine, le thiaméthoxame et le choranthraniliprole, qui sont retrouvés dans plus de 80 % des échantillons analysés (Giroux, 2019). Plusieurs pesticides sont en effet facilement lessivés et terminent leur course dans les plans d'eau, où les larves d'insectes aériens sont vraisemblablement contaminées (Main *et al.*, 2014; Maloney *et al.*, 2017, 2018a, 2018b). Cependant, d'autres voies d'exposition sont probables, par exemple par les voies

respiratoires (Blakley *et al.*, 1999) ou cutanées (Blakley *et al.*, 1999; Mineau *et al.*, 1999). Le stockage, la métabolisation et l'excrétion des pesticides pourraient par ailleurs être mesurés par l'analyse de matrices additionnelles comme les plumes, le sang et les sacs fécaux.

En complément à mon étude qui visait des marqueurs immunitaires et hématologiques, un portrait plus large des effets combinés des pesticides et du parasitisme pourrait inclure les effets sur le système nerveux. En effet, la toxicité de la majorité des insecticides est basée sur leur capacité à interférer dans le fonctionnement des influx nerveux. Par exemple, la mesure de l'activité des cholinestérases sanguines permettrait de vérifier si les individus souffrent de l'exposition aux carbamates et aux organophosphates dans notre système.

Mon étude est l'une des premières à s'intéresser aux effets combinés de l'exposition aux pesticides et aux parasites sur les oiseaux. Puisque les pesticides et les parasites sont omniprésents dans l'environnement, tout laisse croire que de nombreuses autres espèces aviaires pourraient subir des effets similaires. D'autres espèces d'oiseaux champêtres en Amérique du Nord dont le déclin est associé à l'exposition aux pesticides (Mineau et Whiteside, 2013) sont en effet tout aussi susceptibles d'être exposés à des parasites comme *Protocalliphora* ou à d'autres pathogènes communs, par exemple les *Haemosporidians* causant la malaria aviaire (Turcotte *et al.*, 2018) et d'autres parasites sanguins (Dunn *et al.*, 2013). Plus largement, l'exposition à toute substance plus ou moins toxique est susceptible d'avoir des effets additifs ou synergiques avec le parasitisme sur la physiologie de l'hôte. En effet, les oiseaux sont également exposés à d'autres contaminants dans l'environnement comme les métaux lourds (Dauwe *et al.*, 2000; Eeva *et al.*, 2009; Geens *et al.*, 2010), les résidus miniers (Gentes *et al.*, 2007) et plusieurs autres polluants persistants (Echols *et al.*, 2004; Eulaers *et al.*, 2011a, 2011b; Gentes *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2014; Martenson *et al.*, 2016). Les études en écotoxicologie auraient donc tout avantage à considérer l'exposition au parasitisme comme pression additionnelle pour correctement évaluer l'impact des pesticides et des autres contaminants d'origine anthropique sur la faune, comme proposé par plusieurs auteurs (Holmstrup *et al.*, 2010; Marcogliese et Pietrock, 2011; Sures, 2008; Sures *et al.*, 2017).

3.4 Conclusion

Mon projet a permis de mettre en évidence la possibilité d'effets combinés des pesticides agricoles et d'ectoparasites hématophages sur certains marqueurs physiologiques. Les parasites sont rarement pris en compte dans les études écotoxicologiques sur les vertébrés terrestres, et ce, alors que de nombreux effets additifs et synergiques ont été montrés chez des organismes aquatiques et semi-aquatiques. Mon projet permet également d'ajouter une pièce du casse-tête du déclin des insectivores aériens en mettant en relief le potentiel délétère des pesticides sur la physiologie d'une espèce modèle en milieu agricole, où ces substances sont largement utilisées. Les pesticides sont par ailleurs omniprésents dans l'environnement et peuvent affecter un grand nombre d'organismes par leurs effets toxiques létaux et sublétaux. De meilleures réglementations et une utilisation plus avisée des pesticides en agriculture sont indispensables pour limiter les effets négatifs sur la faune sauvage.

L'écophysiologie et la parasitologie environnementale sont des domaines d'études récents et ils présentent un grand potentiel d'approches et de techniques nous permettant de mieux comprendre les systèmes physiologiques des organismes sauvages et comment ceux-ci sont affectés par l'exposition à différents facteurs. Plus d'études en milieu naturel sont ainsi nécessaires pour bien évaluer les effets des pesticides sur la faune, particulièrement en combinaisons avec d'autres pressions environnementales.

ANNEXE

Supplementary Material for

Agricultural pesticides and parasites: possible combined effects on physiology of a declining aerial insectivore

by

Audrey Sigouin, Marc Bélisle, Dany Garant and Fanie Pelletier

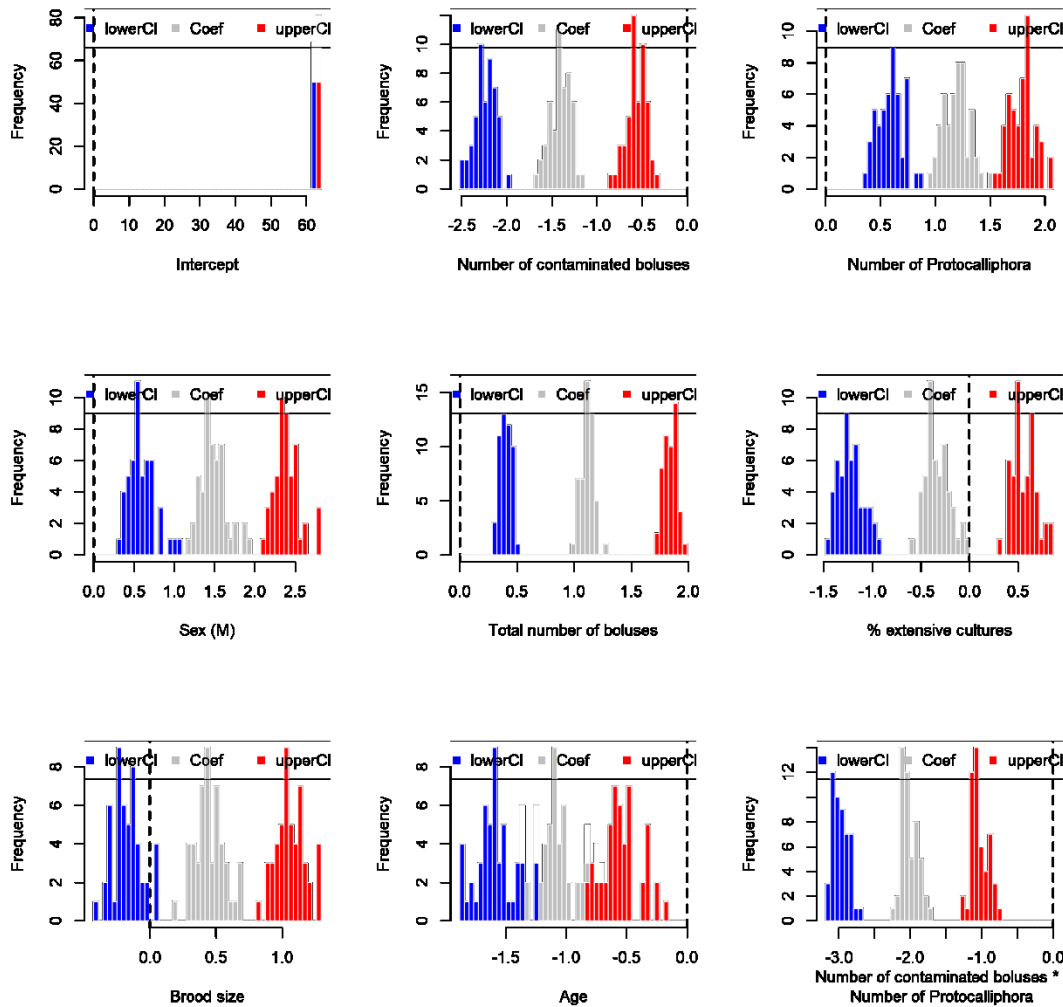


Figure S1 : Frequency of coefficients (grey bars), lower (blue bars) and upper (red bars) 95 % confidence intervals (CI) obtained with a 50 iterations rerunning of the best model to predict hematocrit measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

For each iteration, a single measure of hematocrit was randomly selected for each nestling. Dashed line represents 0. Since CI do not include 0 for parameters of interest (number of contaminated boluses, number of *Protocalliphora* and their interaction), random selection of a single hematocrit measure per nestling does not bias model interpretation.

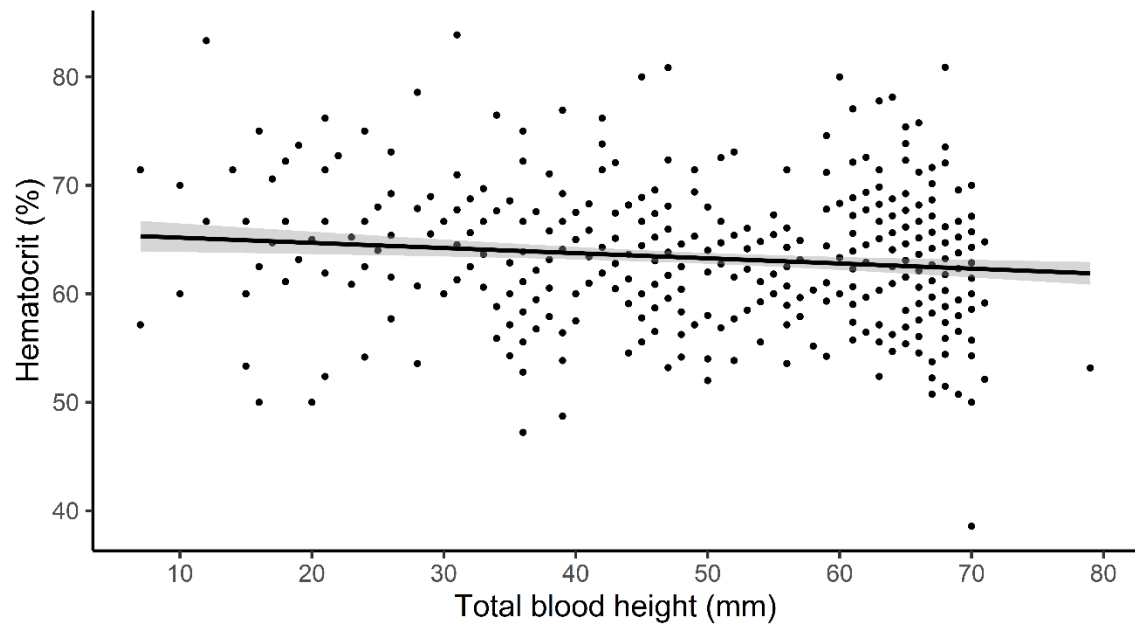


Figure S2 : Hematocrit measured in tree swallow nestlings in 2013-2015 as a function of total blood collected in a capillary tube.

Correlation is -0.13. The grey area represents 95 % CIs.

Table S1 : Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and detection frequency for 54 compounds tested between 2013 and 2015 in insect boluses collected in 10 farms in southern Québec, Canada.

Compounds	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Frequency	Compounds	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Frequency
one.naphthol	0.99	2.4	0	thiacloprid	0.88	1.92	4
aldicarb	1.48	5.22	5	hexazinone	0.39	2.45	0
carbendazim	0.95	2.4	1	imidacloprid	2.08	5.29	4
pyrimethanil	2.43	5.49	0	metobromuron	2.98	8.54	1
thiabendazole	0.78	2.1	4	nitenpyram	1.08	2.77	0
simazine	1.3	3.32	1	pendimethalin	0.93	2.78	3
carbaryl	0.87	2.54	0	metolachlor	1.04	2.32	45
dinotefuran	1.93	4.16	0	imazethapyr	0.81	2.25	29
aldicarb.sulfoxide	0.76	3.31	1	thiamethoxam	1.33	3.58	9
isoproturon	1.39	3.34	0	parathion	4.38	14.41	10
chlorotoluron	1.34	3.23	0	diazinon	0.99	2.26	1
o.methoate	2.64	8.02	0	krezoxim.methyl	3.34	8.84	0
monolinuron	0.96	3.53	0	azinphos.methyl	2.44	7.06	2
atrazine	1.61	4.44	60	phosmet	1.41	3.48	1
methabenzthiazuron	1.35	2.97	0	iprodione	7.53	24.5	0
carbofuran	0.96	2.36	1	malathion	4.79	9.68	0
acetamiprid	1.4	3.4	0	boscalid	1.72	5.36	0
aldicarb.sulfone	2.89	7.4	0	chlorpyrifos	0.49	1.82	2
bendiocarb	1.79	3.69	0	piperonyl.butoxide	0.78	2.1	6
metoxuron	1.15	2.53	0	chlorfenvinphos	2.31	6.05	0
dimethoate	0.84	2.2	0	coumaphos	2.05	4.62	0
terbutylazine	1.03	2.64	0	pyraclostrobin	1.24	3.35	0
sebutylazine	1.01	2.18	0	permethrin	1.16	2.79	0
diuron	1.75	3.54	0	trifloxystrobin	1.31	2.97	3
cyanazine	1.38	3.74	0	spinosad.A	1.04	3.11	1
linuron	5.62	18.82	0	bentazon	2.29	7.39	7
clothianidin	1.74	5.71	22	fludioxonil	10.8	31.6	0

Table S2: Summary of statistical methods used for candidate model selection of the different physiological markers and their respective sample size.

Response variable	Model	Distribution	Function link	N
Hematocrit (%)	Linear with mixed-effect	Gaussian	Identity	513
BKA	Generalized	Binomial	Logit	507
Leucocyte count (granulocytes, lymphocytes, monocytes)	Generalized	Negative binomial	Log	226

Table S3 : Candidate model for hematocrit and information criterion.

Candidate model	Df	AICc	ΔAIC	AICc weight	Cum. weight
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	12	3192.56	0.00	0.40	0.40
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	14	3193.04	0.48	0.32	0.72
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	13	3193.38	0.82	0.27	0.99
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	11	3202.36	9.80	0.00	1.00
Number contaminated boluses + Number <i>Protocalliphora</i> + Year + % extensive cultures	13	3202.94	10.38	0.00	1.00
Number contaminated boluses + Number <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	11	3205.48	12.91	0.00	1.00
Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	10	3207.37	14.81	0.00	1.00
Number contaminated boluses + Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	13	3207.45	14.89	0.00	1.00
Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	11	3209.46	16.89	0.00	1.00
Year + Sex + % extensive cultures	9	3214.42	21.85	0.00	1.00
Number contaminated boluses + Number <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	10	3215.29	22.73	0.00	1.00
Number contaminated boluses	7	3215.50	22.93	0.00	1.00
Number <i>Protocalliphora</i> + Year	9	3216.39	23.82	0.00	1.00
Number <i>Protocalliphora</i>	7	3217.15	24.59	0.00	1.00
Number <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	8	3219.21	26.65	0.00	1.00
Null	4	3233.16	40.60	0.00	1.00

Degree of freedom (df), Akaike information criterion (AICc), the difference of Akaike information criterion between models (ΔAICc), the weighted-Akaike information criterion (AICc weight) and the cumulative weight for each model candidates (Cum. weight) is shown. Random effects include nest box and farm identity. Control variables are nestling's age in all model, number of hatchlings for models including number of *Protocalliphora* and total number of boluses for models including number of contaminated boluses.

Table S4 : Candidate model for bacteria-killing ability and information criterion.

Candidate model	Df	AICc	ΔAIC	AICc weight	Cum. weight
Number contaminated boluses + Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	9	639.10	0.00	0.27	0.27
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + Year + % extensive cultures	9	639.14	0.04	0.27	0.54
Number <i>Protocalliphora</i> + Year	5	640.19	1.09	0.16	0.69
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	9	640.60	1.50	0.13	0.82
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	10	641.18	2.08	0.10	0.92
Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	6	642.11	3.01	0.06	0.98
Number <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	7	644.10	5.00	0.02	1.00
Year + Sex + % extensive cultures	5	649.62	10.51	0.00	1.00
Number <i>Protocalliphora</i>	3	680.72	41.62	0.00	1.00
Number <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	4	682.34	43.23	0.00	1.00
Number contaminated boluses + Number <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	6	683.11	44.01	0.00	1.00
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	7	684.53	45.43	0.00	1.00
Number contaminated boluses + Number <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	7	684.87	45.77	0.00	1.00
Number contaminated boluses * Number <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	8	686.30	47.20	0.00	1.00
Null	1	688.44	49.34	0.00	1.00
Number contaminated boluses	3	688.44	49.34	0.00	1.00

Degree of freedom (df), Akaike information criterion (AICc), the difference of Akaike information criterion between models (ΔAICc), the weighted-Akaike information criterion (AICc weight) and the cumulative weight for each model candidates (Cum. weight) is shown. Control variables are number of hatchlings for models including number of *Protocalliphora* and total number of boluses for models including number of contaminated boluses.

Table S5 : Candidate model for granulocytes and information criterion.

Candidate model	Df	AICc	Δ AIC	AICc weight	Cum. weight
Year + Sex + % extensive cultures	6	1815.86	0.00	0.25	0.25
Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + Year + % extensive cultures	8	1816.32	0.46	0.20	0.45
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year	6	1816.40	0.54	0.19	0.64
Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + Year	7	1817.50	1.64	0.11	0.75
Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	7	1817.50	1.64	0.11	0.86
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	10	1818.81	2.95	0.06	0.91
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	10	1819.84	3.98	0.03	0.95
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + % extensive cultures	10	1820.04	4.18	0.03	0.98
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	11	1820.60	4.74	0.02	1.00
Null	2	1835.50	19.64	0.00	1.00
Number of contaminated boluses	4	1835.69	19.83	0.00	1.00
Number of <i>Protocalliphora</i>	4	1839.23	23.37	0.00	1.00
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	7	1840.82	24.96	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	8	1842.27	26.41	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	9	1843.33	27.47	0.00	1.00

Degree of freedom (df), Akaike information criterion (AICc), the difference of Akaike information criterion between models (Δ AICc), the weighted-Akaike information criterion (AICc weight) and the cumulative weight for each model candidates (Cum. weight) is shown. Control variables are number of hatchlings for models including number of *Protocalliphora* and total number of boluses for models including number of contaminated boluses.

Table S6 : Candidate model for monocytes and information criterion.

Candidate model	Df	AICc	Δ AIC	AICc weight	Cum. weight
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year	6	1359.76	0.00	0.63	0.63
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	7	1361.68	1.92	0.24	0.87
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	8	1363.82	4.06	0.08	0.95
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + % extensive cultures	10	1367.25	7.49	0.01	0.96
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	10	1367.36	7.60	0.01	0.98
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	10	1367.49	7.73	0.01	0.99
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	11	1369.37	9.61	0.01	1.00
Year + Sex + % extensive cultures	6	1370.31	10.54	0.00	1.00
Number of <i>Protocalliphora</i>	4	1415.28	55.52	0.00	1.00
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	7	1415.54	55.78	0.00	1.00
Number of contaminated boluses	4	1415.74	55.97	0.00	1.00
Null	2	1416.70	56.93	0.00	1.00
Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	5	1417.37	57.61	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	8	1417.69	57.93	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	9	1419.26	59.50	0.00	1.00

Degree of freedom (df), Akaike information criterion (AICc), the difference of Akaike information criterion between models (Δ AICc), the weighted-Akaike information criterion (AICc weight) and the cumulative weight for each model candidates (Cum. weight) is shown. Control variables are number of hatchlings for models including number of *Protocalliphora* and total number of boluses for models including number of contaminated boluses.

Table S7 : Candidate model for lymphocytes and information criterion.

Candidate model	Df	AICc	ΔAIC	AICc weight	Cum. weight
Year + Sex + % extensive cultures	6	1772.68	0.00	0.63	0.63
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year	6	1776.32	3.64	0.10	0.74
Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + Year + % extensive cultures	8	1776.61	3.94	0.09	0.82
Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + Year	7	1778.03	5.35	0.04	0.87
Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive culture	7	1778.03	5.35	0.04	0.91
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	10	1778.63	5.95	0.03	0.94
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + % extensive cultures	10	1779.11	6.43	0.03	0.97
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	10	1779.87	7.19	0.02	0.99
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	11	1780.45	7.77	0.01	1.00
Null	2	1785.44	12.76	0.00	1.00
Number of contaminated boluses	4	1788.37	15.70	0.00	1.00
Number of <i>Protocalliphora</i>	4	1789.05	16.37	0.00	1.00
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	7	1791.53	18.85	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	8	1792.96	20.29	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	9	1794.70	22.02	0.00	1.00

Degree of freedom (df), Akaike information criterion (AICc), the difference of Akaike information criterion between models (ΔAICc), the weighted-Akaike information criterion (AICc weight) and the cumulative weight for each model candidates (Cum. weight) is shown. Control variables are number of hatchlings for models including number of *Protocalliphora* and total number of boluses for models including number of contaminated boluses.

Table S8 : Estimates for second best model to predict hematocrit measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	62.35	0.74	60.88	63.66
Number of contaminated boluses	-1.92	0.60	-3.18	-0.93
Number of <i>Protocalliphora</i>	0.95	0.31	0.33	1.52
Year 2014	0.16	0.74	-1.21	1.65
Year 2015	1.43	0.94	-0.20	3.37
Sex (Male)	1.59	0.46	0.70	2.50
Brood size	0.51	0.32	-0.11	1.12
Total number of boluses	1.53	0.49	0.68	2.52
% extensive cultures	-0.76	0.53	-1.78	0.15
Age	-0.93	0.28	-1.45	-0.38
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i>	-2.05	0.51	-3.06	-1.13

Mixed-effect model (with nested random effect of nest box within farm) was fitted with a Gaussian distribution. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013” and female for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold. * Refers to interaction between variables

Table S9 : Estimates for third-best model to predict hematocrit measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	62.69	0.75	61.26	64.11
Number of contaminated boluses	-1.39	0.53	-2.40	-0.38
Number of <i>Protocalliphora</i>	1.04	0.31	0.44	1.63
Year 2014	-0.11	0.73	-1.50	1.33
Year 2015	0.79	0.86	-0.85	2.48
Sex (Male)	1.59	0.46	0.69	2.49
Brood size	0.42	0.31	-0.21	1.01
Total number of boluses	1.17	0.45	0.31	2.03
Age	-1.01	0.27	-1.55	-0.48
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i>	-1.92	0.51	-2.95	-0.95

Mixed-effect model (with nested random effect of nest box within farm) was fitted with a Gaussian distribution. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013” and female for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table S10 : Estimates for second best model to predict bacteria-killing ability measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	1.07	0.25	0.60	1.57
Number of contaminated boluses	0.20	0.18	-0.15	0.54
Number of <i>Protocalliphora</i>	-0.27	0.11	-0.50	-0.05
Year 2014	-1.95	0.30	-2.55	-1.37
Year 2015	-1.85	0.34	-2.54	-1.19
Brood size	0.12	0.10	-0.07	0.32
Total number boluses	-0.42	0.15	-0.73	-0.12
% extensive cultures	0.17	0.14	-0.10	0.43
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i>	0.00	0.16	-0.32	0.32

Generalized linear model was fitted with a binomial distribution and a logit link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table S11 : Estimates for third-best model to predict bacteria-killing ability measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	0.75	0.20	0.36	1.16
Number of <i>Protocalliphora</i>	-0.33	0.11	-0.56	-0.12
Year 2014	-1.58	0.26	-2.09	-1.08
Year 2015	-1.38	0.25	-1.89	-0.89
Brood size	0.06	0.10	-0.13	0.25

Generalized linear model was fitted with a binomial distribution and a logit link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table S12 : Estimates for second best model to predict granulocytes number measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	4.28	0.03	4.21	4.34
Number of <i>Protocalliphora</i>	0.00	0.01	-0.02	0.03
Sex (Male)	-0.03	0.03	-0.08	0.02
Year 2014	-0.18	0.04	-0.25	-0.11
Year 2015	-0.05	0.04	-0.13	0.02
Brood size	0.03	0.01	0.00	0.05
% extensive cultures	-0.03	0.01	-0.05	0.00

Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013. and female for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table S13 : Estimates for third-best model to predict granulocytes number measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	4.26	0.03	4.20	4.32
Number of <i>Protocalliphora</i>	0.01	0.01	-0.02	0.04
Year 2014	-0.18	0.04	-0.25	-0.11
Year 2015	-0.05	0.04	-0.13	0.02
Brood size	0.02	0.01	-0.01	0.05

Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table S14 : Estimates for second best model to predict monocytes number measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	2.22	0.11	2.01	2.42
Number of <i>Protocalliphora</i>	-0.01	0.04	-0.10	0.08
Sex (Male)	0.04	0.09	-0.13	0.21
Year 2014	0.19	0.12	-0.03	0.41
Year 2015	-0.66	0.13	-0.91	-0.42
Brood size	-0.15	0.05	-0.23	-0.06

Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013 and female for “Sex”. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

Table S15 : Candidate model for granulocyte/lymphocyte ratio and information criterion.

Candidate model	Df	AICc	AIC	AICc weight	Cum. weight
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year	7	1508.88	0.00	0.55	0.55
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	8	1510.25	1.38	0.28	0.83
Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	9	1512.31	3.44	0.10	0.93
Year + Sex + % extensive cultures	7	1514.32	5.44	0.04	0.97
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	11	1516.64	7.77	0.01	0.98
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex	11	1516.71	7.84	0.01	0.99
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + % extensive cultures	11	1517.30	8.43	0.01	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Year + Sex + % extensive cultures	12	1518.79	9.91	0.00	1.00
Number of contaminated boluses	5	1536.54	27.66	0.00	1.00
Number of <i>Protocalliphora</i>	5	1536.69	27.81	0.00	1.00
Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	6	1538.77	29.90	0.00	1.00
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	8	1539.72	30.85	0.00	1.00
Number of contaminated boluses + Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	9	1540.95	32.08	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + % extensive cultures	9	1541.80	32.93	0.00	1.00
Number of contaminated boluses * Number of <i>Protocalliphora</i> + Sex + % extensive cultures	10	1543.03	34.16	0.00	1.00
Null	2	1835.50	326.62	0.00	1.00

Degree of freedom (df), Akaike information criterion (AICc), the difference of Akaike information criterion between models ($\Delta AICc$), the weighted-Akaike information criterion (AICc weight) and the cumulative weight for each model candidates (Cum. weight) is shown. Ratio was modeled with number of granulocytes as the response variable and number of lymphocytes as a fixed effect in all models. Control variables are number of hatchlings for models including number of *Protocalliphora* and total number of boluses for models including number of contaminated boluses.

Table S16 : Estimates for best model to predict granulocyte/ lymphocyte ratio measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	4.15	0.02	4.12	4.19
Number of <i>Protocalliphora</i>	0.00	0.01	-0.01	0.02
Year 2014	-0.06	0.02	-0.10	-0.01
Year 2015	0.05	0.02	0.01	0.10
Brood size	0.02	0.01	0.00	0.04
Number of lymphocytes	-0.19	0.01	-0.21	-0.17

Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function, with number of granulocytes as the response variable and number of lymphocytes as a fixed effect in all models. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013. Estimates for which the confidence 95 % interval excludes zero are in bold.

Table S17 : Estimates for second best model to predict granulocyte/ lymphocyte ratio measured in tree swallow nestlings in southern Québec, Canada, 2013-2015.

Variables	Estimate	SE	CI inf	CI sup
Intercept	4.16	0.02	4.12	4.20
Number of <i>Protocalliphora</i>	0.00	0.01	-0.01	0.02
Sex (Male)	-0.01	0.02	-0.05	0.02
Year 2014	-0.06	0.02	-0.10	-0.01
Year 2015	0.05	0.02	0.01	0.10
Brood size	0.02	0.01	0.00	0.04
Number of lymphocytes	-0.19	0.01	-0.21	-0.17

Generalized linear model was fitted with a negative binomial distribution and a log link function, with number of granulocytes as the response variable and number of lymphocytes as a fixed effect in all models. Numeric explanatory variables were standardized (zero mean, unit variance). The reference level for “Year” was 2013 and female for “Sex. Estimates for which the 95 % confidence interval excludes zero are in bold.

BIBLIOGRAPHIE

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2016). *Basic Immunology: Functions and disorder of the Immune System* (St. Louis, Missouri: Elsevier).

Bellavance, V., Bélisle, M., Savage, J., Pelletier, F., and Garant, D. (2018). Influence of agricultural intensification on prey availability and nestling diet in Tree Swallows (*Tachycineta bicolor*). *Can. J. Zool.* 96, 1053–1065.

Benbrook, C.M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 1–15.

Bennett, G.F., and Whitworth, T.L. (1991). Studies on the life history of some species of *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Can. J. Zool.* 69, 2048–2058.

Benton, T.G., Bryant, D.M., Cole, L., and Crick, H.Q.P. (2002). Linking agricultural practice to insect and bird populations : A historical study over three decades Linking agricultural practice to insect and bird populations : a historical study over three decades. *J. Appl. Ecol.* 39, 673–687.

Benton, T.G., Vickery, J.A., and Wilson, J.D. (2003). Farmland biodiversity: Is habitat heterogeneity the key? *Trends Ecol. Evol.* 18, 182–188.

Bishop, C.A., Boermans, H.J., Ng, P., Campbell, G.D., and Struger, J. (1998). Health of tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting in pesticide-sprayed apple orchards in Ontario, Canada. I. Immunological parameters. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 55, 531–559.

Bishop, C.A., Ng, P., Mineau, P., Quinn, J., and Struger, J. (2000). Effects of pesticide spraying on chick growth, behavior, and parental care in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting in an apple orchard in Ontario, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2286–2297.

Blakley, B., Brousseau, P., Fournier, M., and Voccia, I. (1999). Immunotoxicity of pesticides: A review. *Toxicol. Ind. Health* 15, 119–132.

- Blanar, C.A., Curtis, M.A., and Chan, H.M. (2005). Growth, nutritional composition, and hematology of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) exposed to toxaphene and tapeworm (*Diphyllbothrium dendriticum*) larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 397–404.
- Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T.J., Buck, J.C., Gervasi, S.S., and Kats, L.B. (2011). The complexity of amphibian population declines : understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *1223*, 108–119.
- Blus, L.J., and Henny, C.J. (1997). Field Studies on Pesticides and Birds : Unexpected and Unique Relations. *Ecol. Appl.* 7, 1125–1132.
- Booton, R.D., Yamaguchi, R., Marshall, J.A.R., Childs, D.Z., and Iwasa, Y. (2018). Interactions between immunotoxicants and parasite stress : Implications for host health. *J. Theor. Biol.* 445, 120–127.
- Boughton, R.K., Joop, G., Armitage, S.A.O., Boughton, R.K., Joop, G., and Armitage, S.A.O. (2011). Outdoor immunology : methodological considerations for ecologists. *Br. Ecol. Soc.* 25, 81–100.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., and Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47.
- Bright, J., Morris, T., and Winspear, R. (2008). A review of Indirect Effects of Pesticides on Birds and mitigating land-management practices. *RSPB Res. Rep.* 1–66.
- Brommer, J.E. (2004). Immunocompetence and its costs during development: An experimental study in blue tit nestlings. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271, S110–S113.
- Brown, C.R., Brown, M.B., and Rannala, B. (1995). Ectoparasites reduce long-term survival of their avian host. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 262, 313–319.
- Burgess, N.M., Hunt, K.A., Bishop, C.A., and Weseloh, D.V. (Chip) (1999). Cholinesterase inhibition in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) and eastern bluebirds (*Sialia sialis*) exposed to organophosphorus insecticides in apple orchards in Ontario,

Canada. Environ. Toxicol. Chem. *18*, 708–716.

Butler, P.J. (2016). The physiological basis of bird flight. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *371*, 1–11.

Campbell, L.H., Avery, M.I., Donald, P., Evans, A.D., Green, R.E., and Wilson, J.D. (1997). A review of the indirect effects of pesticides on birds. Jt. Nat. Conserv. Committee Rep. *227*, 1–147.

Cavallaro, M.C., Main, A.R., Liber, K., Phillips, I.D., Headley, J. V, and Morrissey, C.A. (2019). Neonicotinoids and other agricultural stressors collectively modify aquatic insect communities. Chemosphere *226*, 945–955.

Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. PLoS One *9*, 1–12.

Chamberlain, D.E., Fuller, R.J., Bunce, G.H., Duckworth, J.C., and Shrubbs, M. (2000). Changes in the Abundance of Farmland Birds in Relation to the Timing of Agricultural Intensification in England and Wales. J. Appl. Ecol. *37*, 771–788.

Christe, P., Møller, A.P., and de Lope, F. (1998). Immunocompetence and Nestling Survival in the House Martin : The Tasty Chick Hypothesis. Oikos *83*, 175–179.

Christe, P., Møller, A.P., Saino, N., and De Lope, F. (2000). Genetic and environmental components of phenotypic variation in immune response and body size of a colonial bird, *Delichon urbica* (the house martin). Heredity (Edinb). *85*, 75–83.

Christin, M.S., Ménard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L., and Fournier, M. (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. Aquat. Toxicol. *67*, 33–43.

Coico, R., and Sunshine, G. (2015). Immunology: a short course (West Sussex, England : Wiley Blackwell).

Cox, C. (1991). Pesticides and Birds : From DDT to Today 's Poisons. J. Pestic. Reform *11*, 1–6.

- Cox, C., and Sorgan, M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* *114*, 1803–1806.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Pinxten, R., and Eens, M. (2000). Can excrement and feathers of nestling songbirds be used as biomonitors for heavy metal pollution? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *39*, 541–546.
- Delhay, J., Jenkins, T., Glaizot, O., and Christe, P. (2018). Avian malaria and bird humoral immune response. *Malar. J.* *17*, 1–8.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., and Roitt, I.M. (2017). *Roitt's essential immunology* (Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell).
- Desforges, J.P.W., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., De Guise, S., and Dietz, R. (2016). Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environ. Int.* *86*, 126–139.
- Dibartolomeis, M., Kegley, S., Mineau, P., Radford, R., and Klein, K. (2019). An assessment of acute insecticide toxicity loading (AITL) of chemical pesticides used on agricultural land in the United States. *PLoS One* *14*, 1–27.
- Didham, R.K., Barbero, F., Collins, C.M., Forister, M.L., Hassall, C., Leather, S.R., Packer, L., Saunders, M.E., and Stewart, A.J.A. (2020). Spotlight on insects: trends, threats and conservation challenges. *Insect Conserv. Divers.* *13*, 99–102.
- Donald, P.F., Green, R.E., and Heath, M.F. (2001). Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proc. R. Soc. B* *268*, 25–29.
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., and Bommel, F.V. (2006). Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990 – 2000. *Agric. Ecosyst. Environ.* *116*, 189–196.
- Dunn, J.C., Goodman, S.J., Benton, T.G., and Hamer, K.C. (2013). Avian blood parasite infection during the non-breeding season: An overlooked issue in declining populations? *BMC Ecol.* *13*, 1–9.

- Dusbábek, F., Škárková-Špaková, V., Vítovec, J., and Šterba, J. (1988). Cutaneous and blood leucocyte response of pigeons to larval *Argas polonicus* feeding. *Folia Parasitol. (Praha)*. 35, 259–268.
- Echols, K.R., Tillitt, D.E., Nichols, J.W., Secord, A.L., and McCarty, J.P. (2004). Accumulation of PCB congeners in nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*) on the Hudson River, New York. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6240–6246.
- Eeva, T., Lehikoinen, E., and Nurmi, J. (1994). Effects of ectoparasites on breeding success of great tits (*Parus major*) and pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in an air pollution gradient. *Can. J. Zool.* 72, 624–635.
- Eeva, T., Ahola, M., and Lehikoinen, E. (2009). Breeding performance of blue tits (*Cyanistes caeruleus*) and great tits (*Parus major*) in a heavy metal polluted area. *Environ. Pollut.* 157, 3126–3131.
- Eisner Pryor, L.J., and Casto, J.M. (2015). Blood-Feeding ectoparasites as developmental stressors: Does corticosterone mediate effects of mite infestation on nestling growth, immunity, and energy availability? *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 323, 466–477.
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., and Morrissey, C.A. (2017). Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., and Morrissey, C.A. (2019). A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science (80-.)*. 365, 1177–1180.
- Etterson, M., Garber, K., and Odenkirchen, E. (2017). Mechanistic modeling of insecticide risks to breeding birds in North American agroecosystems. *PLoS One* 12, 1–23.
- Eulaers, I., Covaci, A., Hofman, J., Nygård, T., Halley, D.J., Pinxten, R., Eens, M., and Jaspers, V.L.B. (2011a). A comparison of non-destructive sampling strategies to assess the exposure of white-tailed eagle nestlings (*Haliaeetus albicilla*) to persistent organic pollutants. *Sci. Total Environ.* 410–411, 258–265.

- Eulaers, I., Covaci, A., Herzke, D., Eens, M., Sonne, C., Moum, T., Schnug, L., Hanssen, S.A., Johnsen, T.V., Bustnes, J.O., et al. (2011b). A first evaluation of the usefulness of feathers of nestling predatory birds for non-destructive biomonitoring of persistent organic pollutants. *Environ. Int.* 37, 622–630.
- Festa-Bianchet, M. (1989). Individual Differences, Parasites, and the Costs of Reproduction for Bighorn Ewes (*Ovis canadensis*). *J. Anim. Ecol.* 58, 785–795.
- Galloway, T., and Handy, R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 12, 345–363.
- Geens, A., Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., and Eens, M. (2010). Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 408, 1174–1179.
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W.W., Emmerson, M., Morales, M.B., Ceryngier, P., Liira, J., Tscharnkte, T., Winqvist, C., et al. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl. Ecol.* 11, 97–105.
- Gentes, M.L., Whitworth, T.L., Waldner, C., Fenton, H., and Smits, J.E. (2007). Tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting on wetlands impacted by oil sands mining are highly parasitized by the bird blow fly *Protocalliphora* spp. *J. Wildl. Dis.* 43, 167–178.
- Gentes, M.L., Letcher, R.J., Caron-Beaudoin, É., and Verreault, J. (2012). Novel flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St. Lawrence River, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9735–9744.
- Ghilain, A., and Bélisle, M. (2008). Breeding Success of Tree Swallows Along A Gradient Of Agricultural Intensification. *Ecol. Appl.* 18, 1140–1154.
- Gibbons, D., Morrissey, C., and Mineau, P. (2014). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 103–118.

- Gibbs, K.E., MacKey, R.L., and Currie, D.J. (2009). Human land use, agriculture, pesticides and losses of imperiled species. *Divers. Distrib.* 15, 242–253.
- Gilbertson, M.-K., Haffner, G.D., Drouillard, K.G., Albert, A., and Dixon, B. (2003). Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 101–110.
- Giroux, I. (2019). Présence de pesticides dans l’eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2015 à 2017 (Ministère de l’Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction générale du suivi de l’environnement, Québec).
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987.
- Graham, A.L., Hayward, A.D., Watt, K.A., Pilkington, J.G., Pemberton, J.M., and Nussey, D.H. (2010). Fitness Correlates of Heritable Variation in Antibody Responsiveness in a Wild Mammal. *Science* (80-.). 330, 662–666.
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P.B., Van Turnhout, C.A.M., De Kroon, H., and Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511, 341–344.
- Hallmann, C.A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Sumser, H., Ho, T., Schwan, H., Stenmans, W., Mu, A., et al. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS One* 12, 1–21.
- Hannam, K. (2006). Ectoparasitic blow flies (*Protocalliphora* sp.) and nestling Eastern Bluebirds (*Sialia sialis*): direct effects and compensatory strategies. *Can. J. Zool.* 84, 921–930.
- Hao, C., Eng, M.L., Sun, F., and Morrissey, C.A. (2018). Part-per-trillion LC-MS / MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Sci. Total Environ.* 644, 1080–1087.

Haroune, L., Cassoulet, R., Lafontaine, M.P., Bélisle, M., Garant, D., Pelletier, F., Cabana, H., and Bellenger, J.P. (2015). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination for multiclass pesticides from insect samples by microwave-assisted solvent extraction followed by a salt-out effect and micro-dispersion purification. *Anal. Chim. Acta* 891, 160–170.

Hart, J.D., Milsom, T.P., Fisher, G., Wilkins, V., Moreby, S.J., Murray, A.W.A., and Robertson, P.A. (2006). The relationship between yellowhammer breeding performance, arthropod abundance and insecticide applications on arable farmland. *J. Appl. Ecol.* 43, 81–91.

Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J., et al. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 114, 40–50.

Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., and Stice, M. (2010). The cause of global amphibian declines : a developmental endocrinologist ' s perspective. *J. Exp. Biol.* 213, 921–933.

Hedrick, S.M., and Diego, S. (2004). The Acquired Immune System : A Vantage from Beneath. 21, 607–615.

Hegemann, A., Alcalde Abril, P., Muheim, R., Sjöberg, S., Alerstam, T., Nilsson, J.Å., and Hasselquist, D. (2018). Immune function and blood parasite infections impact stopover ecology in passerine birds. *Oecologia* 188, 1011–1024.

Holmstrup, M., Bindesbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., et al. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762.

Hong, S.H., Shim, W.J., Han, G.M., Ha, S.Y., Jang, M., Rani, M., Hong, S., and Yeo, G.Y. (2014). Levels and profiles of persistent organic pollutants in resident and migratory birds from an urbanized coastal region of South Korea. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1463–1470.

Hua, J., and Relyea, R. (2014). Chemical cocktails in aquatic systems: Pesticide effects on the response and recovery of >20 animal taxa. *Environ. Pollut.* 189, 18–26.

Jaward, F.M., Farrar, N.J., Harner, T., Sweetman, A.J., and Jones, K.C. (2004). Passive Air Sampling of PCBs, PBDEs, and Organochlorine Pesticides Across Europe. *Environ. Sci. Technol.* 38, 34–41.

Jobin, B., Latendresse, C., Baril, A., Maisonneuve, C., Boutin, C., and Côté, D. (2014). A half-century analysis of landscape dynamics in southern Québec, Canada. *Environ. Monit. Assess.* 186, 2215–2229.

Johnstone, C.P., Reina, R.D., and Lill, A. (2012). Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 861–879.

Jones, J. (2003). Tree Swallows (*Tachycineta bicolor*): A New Model Organism? *Auk* 120, 941–952.

Jones, M.P. (2015). Avian Hematology. *Clin. Lab. Med.* 35, 649–659.

Jones, H., Pekins, P., Kantar, L., Sidor, I., Ellingwood, D., and Lichtenwalner, A. (2019). Mortality assessment of moose (*Alces alces*) calves during successive years of winter tick (*Dermacentor albipictus*) epizootics in New Hampshire and Maine (USA). *Can. J. Zool.* 97, 22–30.

Kalina, J., Scheringer, M., Borůvková, J., Kukučka, P., Příbylová, P., Sáňka, O., Melymuk, L., Váňa, M., and Klánová, J. (2018). Characterizing Spatial Diversity of Passive Sampling Sites for Measuring Levels and Trends of Semivolatile Organic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 52, 10599–10608.

Kim, S., Park, M.Y., Kim, H.J., Shin, J.Y., Ko, K.Y., Kim, D.G., Kim, M., Kang, H.G., So, B., and Park, S.W. (2016). Analysis of Insecticides in Dead Wild Birds in Korea from 2010 to 2013. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96, 25–30.

King, M.O., Owen, J.P., and Schawbl, H. (2011). Injecting the mite into ecological

immunology : measuring the antibody response of house sparrows (*Passer domesticus*) challenged with hematophagous mites. *Auk* 128, 340–345.

Kirk, D.A., Lindsay, K.E., and Brook, R.W. (2011). Risk of Agricultural Practices and Habitat Change to Farmland Birds. *Avian Conserv. Ecol.* 6, art5.

Klink, R. van, Bowler, D.E., Gongalsky, K.B., Swengel, A.B., Gentile, A., and Chase, J.M. (2020). Meta-analysis reveals declines in terrestrial but increases in freshwater insect abundances. *Science* (80-.). 368, 417–420.

Knight, S.M., Bradley, D.W., Clark, R.G., Gow, E.A., Bélisle, M., Berzins, L.L., Blake, T., Bridge, E.S., Burke, L., Dawson, R.D., et al. (2018). Constructing and evaluating a continent-wide migratory songbird network across the annual cycle. *Ecol. Monogr.* 88, 445–460.

Köhler, H.-R., and Triebskorn, R. (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides : Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science* (80-.). 341, 759–766.

Krause, J.S., Németh, Z., Chmura, H.E., Ramenofsky, M., and Wing, J.C. (2016). Annual Hematocrit Profiles in Two Subspecies of White-Crowned Sparrow : A Migrant and a Resident Comparison. *Physiol. Biochem. Zool.* 89, 51–60.

Kwon, Y.-K., Wee, S.-H., and Kim, J.-H. (2004). Pesticide poisoning events in wild birds in Korea from 1998 to 2002. *J. Wildl. Dis.* 40, 737–740.

Labrie, G., Gagnon, M.-È., Vanasse, A., Latraverse, A., and Tremblay, G. (2020). Impacts of neonicotinoid seed treatments on soil-dwelling pest populations and agronomic parameters in corn and soybean in Quebec. *PLoS One* 15, 1–21.

Lebrun, J.D., De Jesus, K., Rouillac, L., Ravelli, M., Guenne, A., and Tournebize, J. (2020). Single and combined effects of insecticides on multi-level biomarkers in the non-target amphipod *Gammarus fossarum* exposed to environmentally realistic levels. *Aquat. Toxicol.* 218, 1–11.

Lill, A., Rajchl, K., Yachou-Wos, L., and Johnstone, C.P. (2013). Are haematocrit and

hemoglobin concentration reliable body condition indicators in nestlings: The Welcome Swallow as a case study. *Avian Biol. Res.* 6, 57–66.

Lochmiller, R.L., and Deerenberg, C. (2000). Just What Is the Cost of Immunity ? *Oikos* 88, 87–98.

de Lope, F., Møller, A., and de la Cruz, C. (1998). Parasitism , immune response and reproductive success in the house martin *Delichon urbica*. *Oecologia* 144, 188–193.

Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Blas, E.G. De, Camarero, P.R., Mougeot, F., and Mateo, R. (2015). Adverse effects of thiram-treated seed ingestion on the reproductive performance and the offspring immune function of the red-legged partridge. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1320–1329.

Main, A.R., Headley, J. V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J., and Morrissey, C.A. (2014). Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada’s prairie pothole region. *PLoS One* 9, 1–12.

Maloney, E.M., Morrissey, C.A., Headley, J. V., Peru, K.M., and Liber, K. (2017). Cumulative toxicity of neonicotinoid insecticide mixtures to *Chironomus dilutus* under acute exposure scenarios. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 3091–3101.

Maloney, E.M., Morrissey, C.A., Headley, J. V., Peru, K.M., and Liber, K. (2018a). Can chronic exposure to imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam mixtures exert greater than additive toxicity in *Chironomus dilutus*? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 354–365.

Maloney, E.M., Liber, K., Headley, J. V., Peru, K.M., and Morrissey, C.A. (2018b). Neonicotinoid insecticide mixtures: Evaluation of laboratory-based toxicity predictions under semi-controlled field conditions. *Environ. Pollut.* 243, 1727–1739.

MAPAQ (2015). Les risques des pesticides: mieux les connaître pour les réduire. 1–6.

Marcogliese, D.J., and Pietrock, M. (2011). Combined effects of parasites and contaminants on animal health: Parasites do matter. *Trends Parasitol.* 27, 123–130.

Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P.,

Champoux, L., McLaughlin, J.D., and Boily, M. (2009). Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquat. Toxicol.* 91, 126–134.

Marcogliese, D.J., Dautremepuits, C., Gendron, A.D., and Fournier, M. (2010). Interactions between parasites and pollutants in yellow perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River, Canada: implications for resistance and tolerance to parasites. *Can. J. Zool.* 88, 247–258.

Markowski, M., Bańbura, M., Gładalski, M., Kaliński, A., Skwarska, J., Wawrzyniak, J., Zieliński, P., and Bańbura, J. (2015). Variation in haematocrit of nestling Blue Tits (*Cyanistes caeruleus*) in central Poland. *Avian Biol. Res.* 8, 179–184.

Martinson, S.C., Drouillard, K.G., and Verreault, J. (2016). Short-term fasts increase levels of halogenated flame retardants in tissues of a wild incubating bird. *Environ. Res.* 146, 73–84.

Martinson, S.C., Marcogliese, D.J., and Verreault, J. (2017). Multiple stressors including contaminant exposure and parasite infection predict spleen mass and energy expenditure in breeding ring-billed gulls. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 200, 42–51.

Martin, L.B., Hopkins, W.A., Mydlarz, L.D., and Rohr, J.R. (2010). The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1195, 129–148.

Mateo, R., Petkov, N., Lopez-Antia, A., Rodríguez-Estival, J., and Green, A.J. (2016). Risk assessment of lead poisoning and pesticide exposure in the declining population of red-breasted goose (*Branta ruficollis*) wintering in Eastern Europe. *Environ. Res.* 151, 359–367.

Matson, K.D., Tieleman, B.I., and Klasing, K.C. (2006). Capture Stress and the Bactericidal Competence of Blood and Plasma in Five Species of Tropical Birds. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 556–564.

Matson, P., Parton, W., Power, A., and Swift, M. (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science* (80-.). 277, 504–509.

Mayne, G.J., Martin, P.A., Bishop, C.A., and Boermans, H.J. (2004). Stress and immune responses of nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*) and eastern bluebirds (*Sialia sialis*) exposed to nonpersistent pesticides and p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2930–2940.

Mayne, G.J., Bishop, C.A., Martin, P.A., Boermans, H.J., and Hunter, B. (2005). Thyroid function in nestling tree swallows and eastern bluebirds exposed to non-persistent pesticides and p, p'-DDE in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Ecotoxicology* 14, 381–396.

Mcnew, S.M., Goodman, G.B., Yépe Rz, J., and Clayton, D.H. (2020). Parasitism by an invasive nest fly reduces future reproduction in Galápagos mockingbirds. *Oecologia* 192, 363–374.

MELCC (2015). Stratégie québécoise sur les pesticides 2015-2018. Retrieved from http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/developpement/strategie_gouvernementale/exemples_actions.pdf.

MELCC (2018). À propos des pesticides. Retrieved from <http://www.environnement.gouv.qc.ca/pesticides/apropos.htm>.

MELCC (2020). Bilan des ventes de pesticides au Québec - Année 2018. Retrieved from www.environnement.gouv.qc.ca/pesticides/bilan/index.htm.

Michel, N.L., Smith, A.C., Clark, R.G., Morrissey, C.A., and Hobson, K.A. (2016). Differences in spatial synchrony and interspecific concordance inform guild-level population trends for aerial insectivorous birds. *Ecography* (Cop.). 39, 774–786.

Mineau, P. (2005). A Review and Analysis of Study Endpoints Relevant to the Assessment of “ Long Term ” Pesticide Toxicity in Avian and Mammalian Wildlife. *Ecotoxicology* 14, 775–799.

- Mineau, P., and Palmer, C. (2013). The Impact of the Nation's Most Widely Used Insecticides on Birds. *Am. Bird Conserv.* 1–96.
- Mineau, P., and Tucker, K.R. (2002). Improving detection of pesticide poisoning in birds. *J. Wildl. Rehabil.* 25, 4–13.
- Mineau, P., and Whiteside, M. (2013). Pesticide Acute Toxicity Is a Better Correlate of U.S. Grassland Bird Declines than Agricultural Intensification. *PLoS One* 8, 1–8.
- Mineau, P., Fletcher, M.R., Glaser, L.C., Thomas, N.J., Brassard, C., Wilson, L.K., Elliott, J.E., Lyon, L.A., Henny, C.J., Bollinger, T., et al. (1999). Poisoning of raptors with organophosphorus and carbamate pesticides with emphasis on Canada, U.S. and U.K. *J. Raptor Res.* 33, 1–37.
- Mnif, W., Hassine, A.I.H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., and Roig, B. (2011). Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 2265–2303.
- Møller, A.P. (1990). Effects of Parasitism by a Haematophagous Mite on Reproduction in the Barn Swallow. *Ecology* 71, 2345–2357.
- Møller, A.P. (2019). Parallel declines in abundance of insects and insectivorous birds in Denmark over 22 years. *Ecol. Evol.* 9, 6581–6587.
- Møller, A.P., Arriero, E., Lobato, E., and Merino, S. (2009). A meta-analysis of parasite virulence in nestling birds. *Biol. Rev.* 84, 567–588.
- Montiel-León, J.M., Munoz, G., Vo Duy, S., Do, D.T., Vaudreuil, M.A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., and Sauvé, S. (2019). Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ. Pollut.* 250, 29–39.
- Murphy, M.T. (2003). Avian Population Trends within the Evolving Agricultural Landscape of Eastern and Central United States. *Auk* 120, 20–34.
- Narváez, C., Ríos, J.M., Píriz, G., Sanchez-Hernandez, J.C., and Sabat, P. (2016).

Subchronic exposure to chlorpyrifos affects energy expenditure and detoxification capacity in juvenile Japanese quails. *Chemosphere* 144, 775–784.

Nespolo, R.F., Gonzalez-Lagos, C., Solano-Iguaran, J.J., Elfving, M., Garitano-Zavala, A., Mañosa, S., Alonso, J.C., and Altimiras, J. (2018). Aerobic power and flight capacity in birds: A phylogenetic test of the heart-size hypothesis. *J. Exp. Biol.* 221, 1–7.

Norris, K., and Evans, M.R. (2000). Ecological immunology : life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11, 19–26.

Norte, A.C., Ramos, J.A., Sousa, J.P., and Sheldon, B.C. (2009). Variation of adult Great Tit *Parus major* body condition and blood parameters in relation to sex, age, year and season. *J. Ornithol.* 150, 651–660.

North American Bird Conservation Initiative Canada (NABCI) (2019). The state of Canada's birds. Environment and Climate Change Canada, Ottawa, Canada.

Nussey, D.H., Watt, K.A., Clark, A., Pilkington, J.G., Pemberton, J.M., Graham, A.L., and McNeilly, T.N. (2014). Multivariate immune defences and fitness in the wild: Complex but ecologically important associations among plasma antibodies, health and survival. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 1–9.

Owen, J.P., Nelson, A.C., and Clayton, D.H. (2010). Ecological immunology of bird-ectoparasite systems. *Trends Parasitol.* 26, 530–539.

Pellerin, S., Paquette, S.R., Pelletier, F., Garant, D., and Bélisle, M. (2016). The trade-off between clutch size and egg mass in tree swallows *Tachycineta bicolor* is modulated by female body mass. *J. Avian Biol.* 47, 500–507.

Pigeon, G., Bélisle, M., Garant, D., Cohen, A.A., and Pelletier, F. (2013). Ecological immunology in a fluctuating environment: An integrative analysis of tree swallow nestling immune defense. *Ecol. Evol.* 3, 1091–1103.

Pirrello, S., Pilastro, A., and Serra, L. (2015). Nest-dwelling ectoparasites influence the start and duration of the first pre-basic moult in the European starling *Sturnus vulgaris*. *J.*

Avian Biol. 46, 412–418.

Pitala, N., Siitari, H., Gustafsson, L., and Brommer, J.E. (2009). Ectoparasites help to maintain variation in cell-mediated immunity in the blue tit-hen flea system. *Evol. Ecol. Res.* 11, 79–94.

Pitala, N., Siitari, H., Gustafsson, L., and Brommer, J.E. (2010). Costs and benefits of experimentally induced changes in the allocation of growth versus immune function under differential exposure to ectoparasites. *PLoS One* 5, 1–8.

Poisson, M.-C. (2019). Effets des pesticides agricoles sur la performance de reproduction d'un insectivore aérien en déclin. Master thesis.

Prado, A., Pioz, M., Vidau, C., Requier, F., Jury, M., Crauser, D., Brunet, J.L., Le Conte, Y., and Alaux, C. (2019). Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. *Sci. Total Environ.* 650, 1250–1260.

Prosser, P.J., Hart, A.D.M., Langton, S.D., McKay, H. V., and Cooke, A.S. (2006). Estimating the rate of poisoning by insecticide-treated seeds in a bird population. *Ecotoxicology* 15, 657–664.

Puchala, P. (2004). Detrimental effects of larval blow flies (*Protocalliphora azurea*) on nestlings and breeding success of Tree Sparrows (*Passer montanus*). *Can. J. Zool.* 82, 1285–1290.

Puerta, M.L., Muñoz Pulido, R., Huecas, V., and Abelenda, M. (1989). Hematology and blood chemistry of chicks of white and black storks (*Ciconia ciconia* and *Ciconia nigra*). *Comp. Biochem. Physiol. - Part A Physiol.* 94, 201–204.

Rahkonen, R., and Pasternack, M. (1998). Effect of experimental *Diphyllbothrium dendriticum* infection on the blood leucocyte pattern of brown trout at two temperature levels. *Boreal Environ. Res.* 3, 381–386.

Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., and Jackson, R. (2011). Écologie des communautés. In *Campbell Biologie*, (Canada: ERPI), pp. 1377–1403.

- Rioux Paquette, S., Garant, D., Pelletier, F., and Bélisle, M. (2013). Seasonal patterns in Tree Swallow prey (Diptera) abundance are affected by agricultural intensification. *Ecol. Appl.* 23, 122–133.
- Rissoli, R.Z., Abdalla, F.C., J, C.M., Randin, F.T., McKenzie, D.J., and Kalinin, A.L. (2016). Chemosphere Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 156, 37–44.
- Robertson, R.J., Stutchbury, B.J., and Cohen, R.R. (1992). Tree swallow. In *The Birds of North America*, (American Ornithologists Union, Washington, D.C., USA), pp. 1–28.
- Robillard, A., Garant, D., and Bélisle, M. (2013). The Swallow and the Sparrow: How agricultural intensification affects abundance, nest site selection and competitive interactions. *Landsc. Ecol.* 28, 201–215.
- Rogers, K.H., Mcmillin, S., Olstad, K.J., and Poppenga, R.H. (2019). Imidacloprid Poisoning of Songbirds Following a Drench Application of Trees in a Residential Neighborhood in. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1724–1727.
- Rohr, J.R., and McCoy, K.A. (2010). A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environ. Health Perspect.* 118, 20–32.
- Rosenberg, K. V, Dokter, A.M., Blancher, P.J., Sauer, J.R., Smith, A.C., Smith, P.A., Stanton, J.C., Panjabi, A., Helft, L., Parr, M., et al. (2019). Decline of the North American avifauna. *Science* (80-.). 1313, 1–10.
- Roth, N., Zoder, S., Zaman, A.A., Thorn, S., and Schmidl, J. (2020). Long-term monitoring reveals decreasing water beetle diversity, loss of specialists and community shifts over the past 28 years. *Insect Conserv. Divers.* 140–150.
- Sabrosky, C.W., Bennett, G.F., and Whitworth, T.L. (1989). *Bird Blow Flies (Protocalliphora) in North America (Diptera: Calliphoridae)*, with notes on the Pelearctic species (Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press).

- Saino, N., Calza, S., and Møller, A.P. (1998). Effects of a Dipteran Ectoparasite on Immune Response and Growth Trade-Offs in Barn Swallow, *Hirundo rustica*. *Oikos* 81, 217–228.
- Sakaluk, S.K., Wilson, A.J., Bowers, E.K., Johnson, L.S., Masters, B.S., Johnson, B.G.P., Vogel, L.A., Forsman, A.M., and Thompson, C.F. (2015). Genetic and environmental variation in condition, cutaneous immunity, and haematocrit in house wrens. *BMC Evol. Biol.* 14, 1–12.
- Samuel, O., Carrier, G., and Lefebvre, L. (2007). Document d'appui à la définition nosologique: Atteinte de systèmes consécutive à une exposition aux insecticides organophosphorés ou carbamates (INSPQ).
- Schmitt, C., Garant, D., Bélisle, M., and Pelletier, F. (2017). Agricultural Intensification Is Linked to Constitutive Innate Immune Function in a Wild Bird Population. *Physiol. Biochem. Zool.* 90, 201–209.
- Sheldon, B.C., and Verhulst, S. (1996). Ecological immunology - costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11, 317–321.
- Shutler, D., Mullie, A., and Clark, R.G. (2004). Tree swallow reproductive investment, stress, and parasites. *Can. J. Zool.* 448, 442–448.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., et al. (2015). Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34.
- Simon, A., Thomas, D., Blondel, J., Perret, P., and Lambrechts, M.M. (2004). Physiological Ecology of Mediterranean Blue Tits (*Parus caeruleus* L.): Effects of Ectoparasites (*Protocalliphora* spp.) and Food Abundance on Metabolic Capacity of Nestlings. *Physiol. Biochem. Zool.* 77, 492–501.
- Simon, A., Thomas, D.W., Bourgault, P., Blondel, J., Perret, P., and Lambrechts, M.M. (2005). Between-population differences in nestling size and hematocrit level in blue tits (

Parus caeruleus): a cross-fostering test for genetic and environmental effects. *Can. J. Zool.* 83, 694–701.

Spiller, K.J., and Dettmers, R. (2019). Evidence for multiple drivers of aerial insectivore declines in North America. *Condor* 121, 1–13.

Stambaugh, T., Houdek, B.J., Lombardo, M.P., Thorpe, P.A., and Caldwell Hahn, D. (2011). Innate Immune Response Development in Nestling Tree Swallows. *Wilson J. Ornithol.* 123, 779–787.

Stanton, R.L., Morrissey, C.A., and Clark, R.G. (2018). Agriculture , Ecosystems and Environment Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America : A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 254, 244–254.

Sures, B. (2006). How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. *J. Helminthol.* 6, 151–157.

Sures, B. (2008). Host-parasite interactions in polluted environments. *J. Fish Biol.* 73, 2133–2142.

Sures, B., Nachev, M., Selbach, C., and Marcogliese, D.J. (2017). Parasite responses to pollution : what we know and where we go in ‘Environmental Parasitology.’ *Parasites and Vectors* 10, 1–20.

Taggart, P.L., Leu, S.T., Spiegel, O., Godfrey, S.S., Sih, A., and Bull, C.M. (2018). Endure your parasites : Sleepy Lizard (*Tiliqua rugosa*) movement is not affected by their ectoparasites. *Can. J. Zool.* 96, 1309–1316.

Thomas, K., and Shutler, D. (2001). Ectoparasites , nestling growth, parental feeding rates, and begging intensity of tree swallows. *Can. J. Zool.* 79, 346–353.

Thomas, D., Shipley, B., Blondel, J., Perret, P., Simon, A., and Lambrechts, M. (2007). Common Paths Link Food Abundance and Ectoparasite Loads to Physiological Performance and Recruitment in Nestling Blue Tits. *Funct. Ecol.* 21, 947–955.

Tieleman, B.I., Croese, E., Helm, B., and Versteegh, M.A. (2010). Repeatability and

individual correlates of microbicidal capacity of bird blood. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 156, 537–540.

Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D’Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., and Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* (80-.). 292, 281–284.

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., and Polasky, S. (2002). Agriculture sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677.

Trudeau, S., Mineau, P., Cartier, S.G., Fitzgerald, G., Wilson, L., Wheler, C., and Knopper, L.D. (2007). Using dried blood spots stored on filter paper to measure cholinesterase activity in wild avian species. *Biomarkers* 12, 145–154.

Turcotte, A., Bélisle, M., Pelletier, F., and Garant, D. (2018). Environmental determinants of haemosporidian parasite prevalence in a declining population of Tree swallows. *Parasitology* 145, 961–970.

Ukalska-Jaruga, A., Smreczak, B., and Siebielec, G. (2020). Assessment of Pesticide Residue Content in Polish Agricultural Soils. *Molecules* 25, 1–17.

Wagner, D.L. (2019). Insect Declines in the Anthropocene. *Annu. Rev. Entomol.* 65, 457–480.

Winkler, D.W., Hallinger, K.K., Ardia, D.R., Robertson, R.J., Stutchbury, B.J., and Cohen, R.R. (2011). Tree Swallow (*Tachycineta bicolor*). In *The Birds of North America Online*, (Cornell lab of ornithology, Ithaca, New York)

Zaller, J.G., and Brühl, C.A. (2019). Editorial: Non-target Effects of Pesticides on Organisms Inhabiting Agroecosystems. *Front. Environ. Sci.* 7, 1–3.

